ZUR MORPHOGENESE DES SEITENLINIENSYSTEMS VON XENOPUS LAEVIS

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt

von

RUDOLF WINKLBAUER

aus Göppingen

1983

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547612_0045

ZUR MORPHOGENESE DES SEITENLINIENSYSTEMS VON XENOPUS LAEVIS

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt

von

RUDOLF WINKLBAUER

aus Göppingen

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 18.2.1983

Dekan: Professor Dr. K.P. Hadeler

1. Berichterstatter: Professor Dr. P. Hausen

2. Berichterstatter: Professor Dr. D. Ammermann

Gesamtherstellung: **aku** - Fotodruck GmbH, 8600 Bamberg

INHALT

	Seite
EINLEITUNG	1
Aufgabenstellung	1
Bisherige Ergebnisse zur Entwicklung des Seitenliniensystems bei Amphibien	4
Das Seitenliniensystem bei Xenopus laevis	9
MATERIAL UND METHODEN	13
Auslösung der Eiablage und Aufzucht der Embryonen und Larven	13
Herstellung von Hautpräparaten	14
Epidermistransplantation	14
Herstellung haploid-triploider Chimären	15
Autoradiografie	15
Paraffinschnitte	16
ERGEBNISSE UND DISKUSSION	17
I. Beschreibung der Normalentwicklung des supraorbitalen Systems und Analyse der Zellbewegungen	17
1. Ergebnisse	17
Normalentwicklung	17
Zur Frage der Integration epidermaler Zellen in das Seitenliniensystem	31
Aktive Verlängerung und passive Streckung des supraorbitalen Primordiums	35
Zum Mechanismus der aktiven Verlängerung des supraorbitalen Primordiums	38
Zur Topologie der Zellvermehrung	40
2. Diskussion	42
Beschreibung der Normalentwicklung	42
Zellbewegungen und die Verlängerung des Primordiums	45

II. Wachstum, Zellteilung und Organbildung im supraorbitalen Seitenliniensystem 51

1. Ergebnisse 51

Kinetik der Zellvermehrung 51

DNA-synthetisierende Zellen im supraorbitalen System 54

Die Anzahl der supraorbitalen Organe 55

Zur Frage des klonalen Ursprungs primärer Seitenlinienorgane 55

Die Divergenz der Organ- und Plaquegrößen 58

Die Häufigkeitsverteilung der Organgrößen wachstumsgehemmter Larven 60

2. Diskussion 63

Modell der Zellteilung und Organbildung im supraorbitalen Seitenliniensystem bis Stadium 47 1/2 63

Die Rolle des Wachstums in der Seitenlinienentwicklung 71

Stammzellen und asymmetrische Zellteilung 74

III. Prinzipien der Musterbildung im supraorbitalen Seitenliniensystem 77

1. Ergebnisse 77

Der Zusammenhang zwischen Zellzahl und Organzahl 77

Triploide supraorbitale Systeme 79

2. Diskussion 81

Einige Prinzipien der Musterbildung im supraorbitalen System 81

Das Seitenliniensystem als periodisches Muster 85

ZUSAMMENFASSUNG UND EINORDNUNG DER ERGEBNISSE 89

LITERATUR 94

DANKSAGUNG 106

LEBENSLAUF 107

EINLEITUNG

Aufgabenstellung

Entwicklungsvorgänge an vielzelligen Organismen können auf verschiedenen, hierarchisch angeordneten Ebenen untersucht werden, z. B. auf molekularer, auf zellulärer, auf Gewebsebene. Dabei werden auf einer höheren Ebene makroskopische Variablen eingeführt, die durch eine Vielfalt komplexer Wechselwirkungen zwischen den Elementen der niedrigeren Ebenen bestimmt sind; eine Kenntnis dieser bestimmenden Wechselwirkungen ist dabei aber nicht notwendig (Alberch, 1982; Oster und Alberch, 1982). So sind z. B. die Eigenschaften einer Zelle letztlich durch physikalisch-chemische Wechselwirkungen zwischen Molekülen bestimmt. Ohne jedoch im einzelnen darauf Bezug zu nehmen, kann man Zelleigenschaften wie Mobilität, Adhäsivität, Teilungsaktivität definieren und damit Entwicklungsvorgänge auf Zellebene untersuchen und erklären.

Da es nur auf diese Weise gelingt, die Komplexität von Entwicklungsvorgängen handhabbar zu machen, ist es nicht nur möglich, sondern unbedingt notwendig, auf allen Ebenen der hierarchischen Organisation lebender Organismen entwicklungsbiologische Vorgänge zu untersuchen. Eine Beschreibung etwa des Gastrulationsvorganges eines beliebigen Metazoen ausschließlich in molekularen Begriffen wäre mit einiger Sicherheit nicht verstehbar.

Diese Auffassung wendet sich gegen einen übertriebenen Reduktionismus in der Entwicklungsbiologie, wonach nur die Rückführung von Entwicklungsprozessen auf molekulare Wechselwirkungen eine berechtigte Aufgabe dieser Wissenschaft sei. Entwicklungsvorgänge sind letztlich genetisch bestimmt, in dem Sinne, daß eine stabile Änderung ihres Verlaufs eine Änderung im Genom des betreffenden Organismus zur Voraussetzung hat. Der Zusammenhang zwischen der Vererbung von Eigenschaften und der Verwirklichung der genetischen Information im Verlauf der Ontogenese ist seit langem ein ungelöstes Grundproblem der Biologie (Mayr, 1982). Die Fragen der Weitergabe und der Ablesung und Übersetzung der Erbinformation wurden in den wesentlichen Zügen auf molekularer Ebene geklärt. Es ist daher naheliegend und berechtigt, den Zusammenhang zwischen der Genetik und der Entwicklungsbiologie auf molekularer Ebene herstellen zu wollen. Dies kann aber, wie dargelegt, immer nur eine Richtung des Vorgehens in der Entwicklungsbiologie sein, Untersuchungen auf den höheren Ebenen der Organisation sind dadurch nicht zu ersetzen.

Die Hoffnung, daß auf molekularer Ebene Entwicklungsvorgänge größere Einheitlichkeit zeigten als auf höheren Organisationsstufen (z. B. Wolpert, 1971), bedarf noch der Rechtfertigung durch experimentelle Befunde. Sollten allgemeine Charakteristika, Regelmäßigkeiten, einheitliche Strategien in Entwicklungsvorgängen verwirklicht sein, so können diese nur gefunden werden durch den Vergleich einer genügenden Anzahl von gut untersuchten Beispielen, und zwar wiederum auf allen Ebenen der Organisation.

Vor dem Hintergrund dieser Überlegungen haben wir uns entschieden, die Morphogenese des Seitenliniensystems bei Amphibien auf Zellebene zu untersuchen. Von Morphogenese spricht man, wenn bei der Untersuchung eines Entwicklungsvorgangs die Änderung der räumlichen Gestalt - eines Organells, einer Zelle, eines Organs - im Vordergrund steht. Ein Weg zum besseren Verständnis solcher morphogenetischer Prozesse ist, an einem überschaubaren, aber hinreichend komplexen System das Zusammenspiel der beteiligten morphogenetischen Mechanismen quantitativ und so vollständig wie möglich zu beschreiben, um den Einfluß einzelner Faktoren auf die Gestaltbildung abschätzen und Systemeigenschaften erklären zu können, die sich gerade aus dem Zusammenwirken verschiedener Faktoren ergeben.

Ähnliche Untersuchungen auf Zellebene wurden an einer Reihe von Systemen durchgeführt. Einige Beispiele aus dem Bereich der Amphibienentwicklung seien herausgegriffen. Keller und Schoenwolf (1977) und Keller (1978, 1980, 1981) beschrieben im einzelnen den Beitrag verschiedener Zellaktivitäten zu den Gastrulationsbewegungen bei Xenopus. Eine Anzahl von Autoren untersuchte den Vorgang der Somitenbildung in Amphibien, insbesonders die Regeln, nach denen das segmentale Muster der Somiten gebildet wird (Übersicht bei Cooke, 1977; weitere Literatur bei Woo Youn et al. 1980). Die Wegfindung eines wandernden Zellverbandes war ein Hauptgesichtpunkt, unter dem Poole und Steinberg (1978, 1981, 1982) ältere Untersuchungen über die Bildung des Urnierenganges wieder aufnahmen.

Die Erweiterung der Vergleichsbasis in Hinsicht auf Entwicklungssysteme, die auf Zellebene ausreichend charakterisiert sind, etwa im Sinne der zitierten Arbeiten, ist das Ziel der mit der vorliegenden Arbeit begonnenen Untersuchung. Die besondere Eignung des Seitenliniensystems für dieses Vorhaben wird durch eine Zusammenfassung der bisher darüber bekannt gewordenen Ergebnisse deutlich werden.

Bisherige Ergebnisse zur Entwicklung des Seitenliniensystems bei Amphibien

Ein Seitenliniensystem aus mechanorezeptorischen Sinnesorganen, die in der Haut in Reihen oder Gruppen angeordnet sind, ist bei Cyclostomen, bei Knorpel- und Knochenfischen, bei aquatischen Amphibienlarven und bei einigen adulten Amphibien vorhanden. Cyclostomen, einige Knochenfische und alle Amphibien haben nur frei an der Oberfläche liegende Organe. In vielen Fischen werden dagegen einige Organe in Seitenlinienkanäle oder Ampullen versenkt, die über Poren mit dem Außenmedium in Verbindung stehen (Übersicht bei Wright, 1951; Dijkgraaf, 1962).

Der Bau der Sinnesorgane in den verschiedenen systematischen Gruppen ist recht ähnlich (Abb. 1). Sie erscheinen im allgemeinen als eine "birnenförmige" (Wright, 1951) Anhäufung von Zellen in der Epidermis. Jedes Organ enthält in der Mitte einige keulen- oder flaschenförmig gestreckte Rezeptorzellen, die mit dem schmalen Ende die freie Oberfläche erreichen und dort ein Kinocilium und mehrere Stereocilien tragen. Die

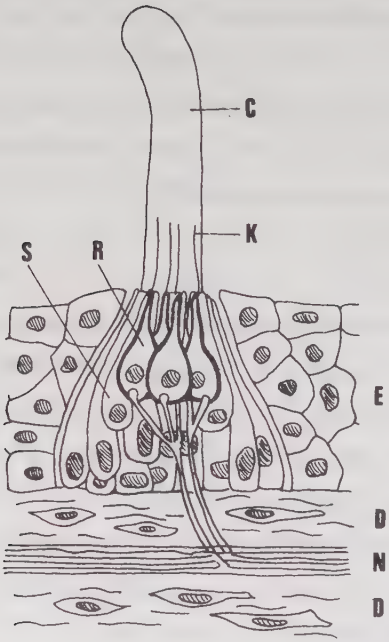

Abb. 1. Schnitt durch ein Seitenlinienorgan (schematisch). In der Epidermis (E) befindliche Rezeptorzellen (R) sind allseitig von Stützzellen (S) umgeben. Die ins Außenmedium ragenden Kinocilien (K) der Rezeptorzellen sind in eine gallertige Cupula (C) eingebettet. Das Organ wird von einem in der Dermis (D) verlaufenden Nerven (N) versorgt.

langen Kinocilien aller Rezeptorzellen eines Organs sind oft in eine gallertartige Cupula eingebettet. Von bestimmten Gehirnganglien kommende Nerven enden am basalen Teil der Rezeptorzellen. Die Sinneszellen sind auf allen Seiten von ebenfalls meist in die Länge gestreckten Stütz- oder Begleitzellen umgeben. Eine Hauptfunktion der Seitenlinienorgane scheint die Wahrnehmung von Wasserbewegungen relativ zur Hautoberfläche zu sein (Wright, 1951; Dijkgraaf, 1962; Shelton, 1971).

Die Entwicklung des Seitenliniensystems wurde vor allem bei Amphibien genauer untersucht. Die experimentelle Analyse der Seitenlinienentwicklung, mit "entwicklungsphysiologischen" Fragestellungen im Vordergrund, beginnt mit der Untersuchung von Harrison (1904) an verschiedenen Rana-Arten. Eine Zusammenfassung und Diskussion der bis dahin veröffentlichten, rein morphologisch und entwicklungsgeschichtlich ausgerichteten Arbeiten findet sich dort. Stone setzte die entwicklungsphysiologische Analyse an Ambystoma-Embryonen fort (1922, 1923, 1925, 1928a,b,c, 1929, 1931, 1933, 1935, 1936, 1937). Die morphologische Beschreibung wurde von Landacre (1926, 1928) an Ambystoma jeffersonianum und von Knouff (1935) an Rana pipiens weitergeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden von Wright (1947) ergänzt und in einem Übersichtsartikel (Wright, 1951) zusammengefaßt. Zusammen mit einer elektronenmikroskopischen Untersuchung der Seitenlinienentwicklung bei Triturus pyrrhogaster (Sato, 1976) liegen sie auch der folgenden kurzen Darstellung zugrunde.

Die Entwicklung des Seitenliniensystems geht von zwei Verdickungen der inneren Schicht der Epidermis in der Ohrregion des Embryos aus, der präauditorischen und der postauditorischen Plakode. Teile beider Plakoden teilen sich nach einem festen Muster in verschiedene Primordien auf, aus denen dann jeweils eine bestimmte Linie oder Gruppe von Organen entsteht. Dazu beginnen die Zellen eines Primordiums, zu einem definierten Zeitpunkt auf einem festgelegten Weg in der Epidermis, zwischen äußerer Epidermiszellschicht und Basalmembran, auszuwandern. Ein wanderndes Primordium läßt auf seinem Weg in mehr oder weniger regelmäßigen Abständen isolierte Gruppen von Zellen zurück, die primären Organe einer Linie. Der ganze Vorgang kann, nach Transplantation einer vitalgefärbten Plakode auf einen ungefärbten Empfänger, am lebenden Embryo verfolgt werden. Exstirpation einer Plakode oder eines Primordiums verhindert die Bildung entsprechender Seitenlinien.

Heterochrone Transplantationen zeigten, daß die Primordien autonom sind in Bezug auf den Zeitpunkt des Auswanderns. Bei Beginn des Auswanderns liegt die Wachstumspotenz eines Primordiums, Zahl und Größe der zu bildenden Organe, bereits fest. Seine Polarität, die Richtung des Auswachsens, ist dann ebenfalls vollständig bestimmt, nach einer vorhergehenden Phase labiler Determination. Die Wanderung der Primordien erfolgt in festgelegten "Wachstumsbahnen" (Harrison, 1904), die in beiden Richtungen durchgängig sind. Die tatsächlich eingeschlagene Richtung wird durch die Polarität der Primordien bestimmt. Wird ein Primordium durch experimentelle

Eingriffe aus seiner Bahn abgelenkt, so kann es unter Umständen auch normalerweise nicht benützte Wege nehmen. Trifft es jedoch wieder auf eine Bahn, so folgt es auf jeden Fall dieser.

Ein wanderndes Primordium schnürt an seinem hinteren Ende fortlaufend Organe ab, bis das Material des Primordiums schließlich vollständig aufgebraucht ist. Das letzte in einer so gebildeten Reihe von Organen kann durch Knospung ein weiteres Organ abgeben, welches dann ebenfalls wieder knospen kann, und so fort, so daß eine nachträgliche Verlängerung einer Linie, z. B. im auswachsenden Schwanz, möglich ist. Alle primären Organe einer Linie geben in einem weiteren Knospungsprozeß sekundäre Organe in artspezifischer Zahl und Anordnung ab. Die Transplantation von Plakoden zwischen verschiedenen Arten zeigte, daß dieses Muster der sekundären Organbildung ausschließlich durch die Herkunft der Plakode bestimmt ist und nicht durch die Umgebung im Empfänger beeinflußt wird. Knospung in dem einer Wunde am nächsten liegenden Organ zur Wunde hin kann zur Regeneration einer Linie führen.

Vom Auswandern der Primordien an werden in keinem Entwicklungsstadium Zellen der Epidermis in das Seitenliniensystem integriert; alle Zellen des Systems sind primordialen Ursprungs. Die Axone der Seitenliniennerven wandern mit den Primordien aus. Sie sind aber für die normale Entwicklung des Systems nicht notwendig.

Einige Grundzüge der Seitenlinienentwicklung sind somit seit längerer Zeit bekannt. Viele Fragen aber, die sich nach den inzwischen erfolgten konzeptionellen und methodischen Veränderungen in der Entwicklungsbiologie hier stellen, sind offen (man denke bei diesen Veränderungen zum Beispiel an das gewachsene Interesse an allgemeinen Prinzipien und Regeln der biologischen Musterbildung ("pattern formation") (Wolpert, 1971; French et al. 1976; Goodwin, 1982), an die Anwendung systemtheoretischer Überlegungen auf Entwicklungsprozesse (Turing, 1952; Thom, 1968; Gierer, 1981), an die Fortschritte auf den Gebieten der Zell- und Molekularbiologie, die eine Analyse von Entwicklungsvorgängen auf zellulärer und molekularer Ebene nahelegen). Eine Wiederaufnahme der Untersuchungen am Seitenliniensystem unter moderneren entwicklungsbiologischen Gesichtspunkten erscheint wünschenswert. Der Ablauf wesentlicher Entwicklungsvorgänge in der Fläche, eine überschaubar kleine Zahl von beteiligten Zellen, eine verhältnismäßig große Autonomie des Seitenliniensystems während der Entwicklung erlauben die Anwendung einfacher Untersuchungsmethoden, die leichte Durchführung quantitativer Analysen und die Konzentration auf Wechselwirkungen zwischen morphogenetischen Mechanismen innerhalb des Systems.

Das Seitenliniensystem bei Xenopus laevis

Als Versuchsobjekt wurde der südafrikanische Krallenfrosch Xenopus laevis (DAUDIN) gewählt. Diese Amphibienart ist einfach im Labor zu halten, liefert ganzjährig entwicklungsfähige Eier in großer Zahl und ist entwicklungsbiologisch gut

charakterisiert. Das Seitenliniensystem in Adulten - im Zusammenhang mit ihrer aquatischen Lebensweise bleibt bei Xenopus-Arten dieses System auch nach der Metamorphose erhalten - wurde von Escher (1925), Horst (1934), Paterson (1939) und Murray (1955) beschrieben. Den Verlauf einiger Linien im Larvenstadium nach Shelton (1970) zeigt Abb. 2. Drei Seitenlinienkomplexe werden vom vorderen Lateralisnerv versorgt: der supraorbitale (supraorbitale und parietale Linie), der infraorbitale (postorbitale und infraorbitale Linie) und der hyomandibulare Komplex (tentakulare, präorbitale, mandibulare und hyomandibulare Linie). Der hintere Lateralisnerv versorgt fünf Komplexe: die occipitale Linie, die aortische Linie, den unteren lateralen Komplex (mit einem anterioren und einem posterioren Liniensystem), die mittlere und die obere laterale Linie. Zu diesen Linien kommen noch eine vordere und eine hintere auditorische Gruppe von Organen.

Eine knappe Übersicht über die Entwicklung des Organsystems findet sich bei Nieuwkoop und Faber (1967). Einige der oben genannten Linien werden dabei auf bestimmte Primordien zurückgeführt. Die Entwicklung der Primordien aus der präauditorischen und der postauditorischen Plakode ist für Xenopus nicht beschrieben. Veränderungen im Liniensystem während der Metamorphose wurden von Shelton (1970) untersucht.

Die mit der vorliegenden Arbeit begonnene Untersuchung beschränkt sich zunächst auf das supraorbitale Liniensystem, da dieses am deutlichsten gegen andere Linien abgegrenzt ist und außerdem früh seine endgültige Organzahl erreicht, im

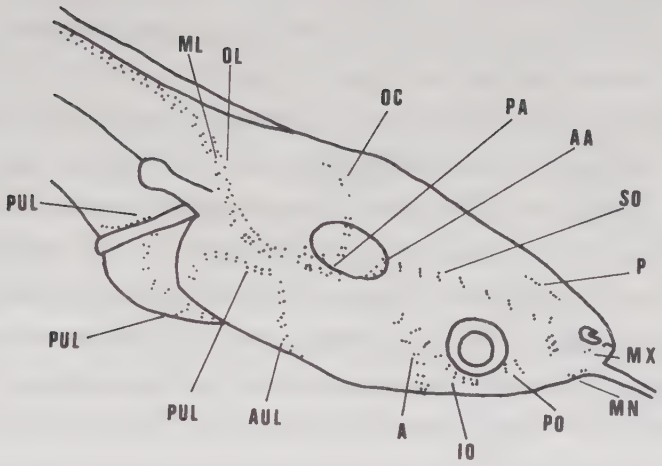

Abb. 2. Verlauf der Seitenlinien in Xenopus-Larven (Stadium 55) bei seitlicher Ansicht. Am vorderen Rand des Ohrbläschens die anteriore auditorische Gruppe von Organen (AA), daran anschließend die über dem Auge verlaufende supraorbitale Linie (SO), dorsal davon die parietale Linie (P). Die maxillare (MX) und die mandibulare (MN) Linie über bzw. unter der Mundöffnung. Unter dem Auge die infraorbitale (IO) und die präorbitale (PO) Linie, dahinter die aortische Linie (A). Am hinteren ventralen Ohrbläschenrand die posteriore auditorische Gruppe von Organen (PA), darüber die nach hinten gekrümmte occipitale Linie (OC). Vom hinteren Rand des Ohrbläschens ausgehend nach hinten die obere (OL) und mittlere (ML) laterale Linie. Die untere laterale Linie geteilt in einen anterioren (AUL) und einen posterioren Zweig (PUL).

Gegensatz etwa zu den sich ständig durch Knospung verlängernden lateralen Linien. Im ersten Teil der Arbeit wird die Normalentwicklung des supraorbitalen Systems beschrieben, und einige Aspekte der Zellbewegungen während des Auswachsens des Primordiums werden analysiert. Insbesonders wird gefragt, ob auch in dieses System Epidermiszellen nicht integriert werden, welchen relativen Beitrag zur Verlängerung aktive Ausdehnung und passive, durch Hautwachstum bewirkte Streckung der Linie leisten, ob Änderungen in der Anordnung der Zellen, in Größe und Form der Zellen oder in der Zellzahl die mit dem Auswachsen verbundene Verlängerung des Primordiums erlauben, und ob eine besondere Wachstumszone im Primordium vorhanden ist. Im zweiten Teil steht das Wachstum des supraorbitalen Systems durch Zellvermehrung im Mittelpunkt. Es wird untersucht, ob das ganze Primordium oder die einzelnen Organe Zellklone sind, wie die Zellzahl im Verlauf der Entwicklung zunimmt, wieviele Zellen des Systems sich dabei jeweils in der S-Phase des Zellzyklus befinden. Aus der Größenverteilung der Organe kann ein Modell der Zellvermehrung und der Organbildung im supraorbitalen System abgeleitet werden, das einige unerwartete Eigenschaften des Systems einfach und quantitativ erklärt. Im dritten Teil schließlich werden einige Fragen der Musterbildung behandelt, der Prinzipien, nach denen Zahl und Größe der Organe bei der Aufteilung des Primordiums festgelegt wird.

MATERIAL UND METHODEN

Auslösung der Eiablage und Aufzucht der Embryonen und Larven

Paarung und Eiablage wurden bei X. laevis und X. borealis künstlich induziert durch Injektion von menschlichem Chorion-Gonadotropin (Serva) in den dorsalen Lymphsack (bei X. laevis beide Geschlechter je 500 Einheiten; bei X. borealis Männchen 50 Einheiten, 24 Std. später 75 Einheiten, 8 Std. später 150 Einheiten; Weibchen 50 Einheiten, 24 Std. später 150 Einheiten, 8 Std. später 300 Einheiten). Je ein Männchen und Weibchen wurden nach der (letzten) Injektion in einem abgedunkelten Käfig bei einer Wassertemperatur von etwa 24 °C zusammengesetzt. Nach etwa 10 - 14 Std. erfolgte die Eiablage.

Die Embryonen wurden in Leitungswasser oder 1/10 Modified Barth's Solution (MBS-H, Elsdale et al. 1960) bei 22 °C gehalten. Ab dem 5. Tag wurden die Larven mit Brennesselpulver gefüttert, ab dem 12. Tag wurde die Temperatur auf 24 °C erhöht. Unter diesen Bedingungen entwickelten sich die meisten Embryonen und Larven in genauer Übereinstimmung mit dem in der Normaltafel von Nieuwkoop und Faber (1967) angegebenen Zeitplan. Die Entwicklungsstadien wurden nach dieser Normaltafel bestimmt. War der zeitliche Abstand zwischen zwei Stadien für unsere Zwecke zu groß, so wurde ein Zwischenstadium definiert, zeitlich genau in der Mitte zwischen beiden, und durch Anfügen von "1/2" and die Bezeichnung des früheren der beiden Stadien gekennzeichnet.

Herstellung von Hautpräparaten

Embryonen und Larven wurden in 4 % Formaldehyd (pH 7, in 1/5 MBS-H) fixiert und aufbewahrt. Eine Schrumpfung durch die Fixierung konnte auch nach 6monatiger Lagerung in Formaldehyd nicht beobachtet werden. Zum Anfärben der Zellkerne wurden die fixierten Tiere 10 min in eine wässrige Lösung von 1 µg/ml 4,6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI, Boehringer Mannheim) gelegt, einem DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff. Danach wurde der vordere Teil eines Larvenkörpers in der Medianebene durchgeschnitten, und von jeder Hälfte wurde die Haut mit Uhrmacherpinzetten abgezogen und in destilliertem Wasser zwischen zwei Deckgläsern eingeschlossen. Die Hautpräparate wurden an einem Zeiss ICM 35-Mikroskop mit Auflichtfluoreszenzausrüstung auf Ilford HP5-Schwarzweiß-Filme fotografiert.

Epidermistransplantation

Die Eihülle der Embryonen von X. laevis und X. borealis wurde mit Uhrmacherpinzetten entfernt. Die Transplantation wurde in MBS-H durchgeführt, in Schalen mit paraffinbedecktem Boden. Mit einer elektrolytisch angespitzten Wolframnadel wurden Epidermisstücke mit etwas darunterliegendem, anhaftendem Material aus X. borealis-Embryonen des Stadium 22 herausgeschnitten und homotop in die Epidermis gleich alter Larven von X. laevis implantiert. Nach der Einheilung, nach etwa 2 Std., wurden die Tiere wieder in 1/10 MBS-H überführt.

Herstellung haploid-triploider Chimären

Haploid-triploide Chimären wurden nach der Methode von Jacobson und Hirose (1978) hergestellt. Weibchen von X. laevis wurde menschliches Chorion-Gonadotropin injiziert (500 Einheiten). Nach 10 - 14 Std. wurden die Weibchen durch sanften Druck auf die dorsale Körperwand in der Nähe der Kloake zur Ablage von Eiern gebracht. Die Eier wurden sofort durch Zugabe von frisch in 1/10 MBS-H mazeriertem Hoden befruchtet und danach in 1/10 MBS-H gegeben. Genau 20 min nach Befruchtung wurden sie für genau 6 min auf 35,5 ^{o}C erwärmt und danach sofort wieder auf 20 ^{o}C abgekühlt. Kurz vor der Schließung des Neuralrohres können durch diese Behandlung erzeugte haploid-triploide Chimären erkannt werden an der ungleichen Höhe der beiden Neuralwülste und an der unterschiedlichen Zellgröße von rechtem und linkem seitlichem Ektoderm. Nach Fixierung und Färbung mit DAPI können in allen späteren Stadien haploide und triploide Zellen in der Epidermis wegen der unterschiedlichen Größe ihrer Zellkerne unterschieden werden.

Autoradiografie

Zur Markierung DNA-synthetisierender Kerne wurde entlang dem unteren Augenrand der Tiere die Epidermis eingeschnitten, um die Aufnahme des (Methyl-^{3}H)-Thymidin (47,5 Ci/mmol; 400 µCi/ml in 1/10 MBS-H) zu ermöglichen. Nach einem Puls von 30 min wurden die Tiere in 4 % Formaldehyd für 24 Std. fixiert und danach mehrmals gewaschen, um den Rest an löslichem

radioaktivem Material zu entfernen. Hautpräparate solcher Tiere wurden in 15 % Äthanol auf gelatinebeschichtete Objektträger übertragen und bei 40 °C angetrocknet. Für die Autoradiografie wurden Ilford L4 Fotoemulsion und Kodak D19 Entwickler verwendet. Die Expositionszeit betrug, um eine immer gleich starke Markierungsdichte zu erreichen, 18 Tage für die Stadien 35/36, 39 und 39 1/2 und 9 Tage für spätere Stadien. Nach Färbung der Zellkerne mit DAPI wurden die Präparate unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Die Silberkörner der Markierung hoben sich sehr gut gegen den Hintergrund der hell fluoreszierenden Kerne ab.

Paraffinschnitte

Embryonen der Stadien 33/34 und 39 wurden fixiert nach Carnoy und über 100 % Äthanol, Methylbenzoat und Xylol in Paraffin eingebettet. Serienschnitte einer Dicke von 8 µm wurden auf gelatinebeschichtete Objektträger aufgeklebt und nach Entparaffinisierung mit DAPI (1 µg/ml) gefärbt.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

I. Beschreibung der Normalentwicklung des supraorbitalen Systems und Analyse der Zellbewegungen

1. Ergebnisse

Normalentwicklung

Die Epidermis der Embryonen und Larven von Xenopus ist zweischichtig. Die flachen Zellen in beiden Schichten enthalten sehr stark in der Ebene der Epidermis abgeflachte Zellkerne. Die Zellen des Seitenliniensystems sind immer länglich und senkrecht zur Epidermisoberfläche ausgerichtet. Sie bilden eine einzige Schicht und besitzen runde oder längliche, in der Richtung der Zellachse liegende Kerne (Abb. 3). Färbt man die Epidermis mit einem ausschließlich an DNA bindenden fluoreszierenden Farbstoff, so erscheinen im Fluoreszenzmikroskop in der Aufsicht die flachen Kerne der epidermalen Zellen groß und wenig intensiv leuchtend, die Zellkerne des Seitenliniensystems dagegen klein, dicht zusammengedrängt und sehr hell. So ist es möglich, die Entwicklung des Seitenliniensystems über alle Stadien zu verfolgen.

An Hautpräparaten von Embryonen des Stadiums 33/34 kann man in der Kopfregion einige Orientierungspunkte erkennen (Abb. 4a): die Riechgrube, einen Rest der Linse, die zu diesem Zeitpunkt noch nicht vollständig von der Epidermis abgelöst

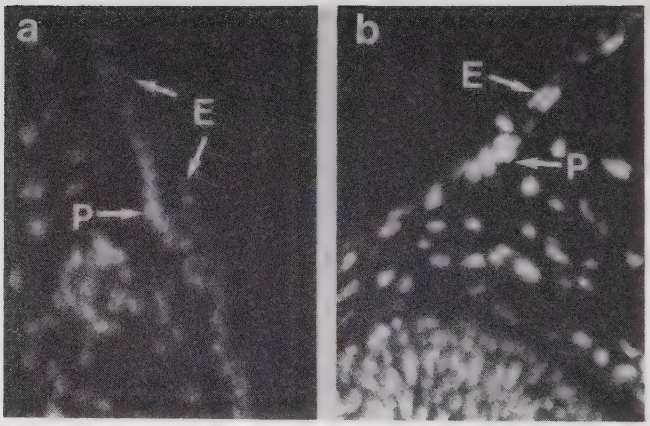

Abb. 3. Querschnitte durch Xenopus-Embryonen der Stadien 33/34 (a) und 39 (b) (Ausschnitte). Nach Färbung der Paraffinschnitte (8 µm) mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI können die Zellkerne des supraorbitalen Primordiums (P) von den flachen Zellkernen der zweischichtigen embryonalen Epidermis (E) unterschieden werden.

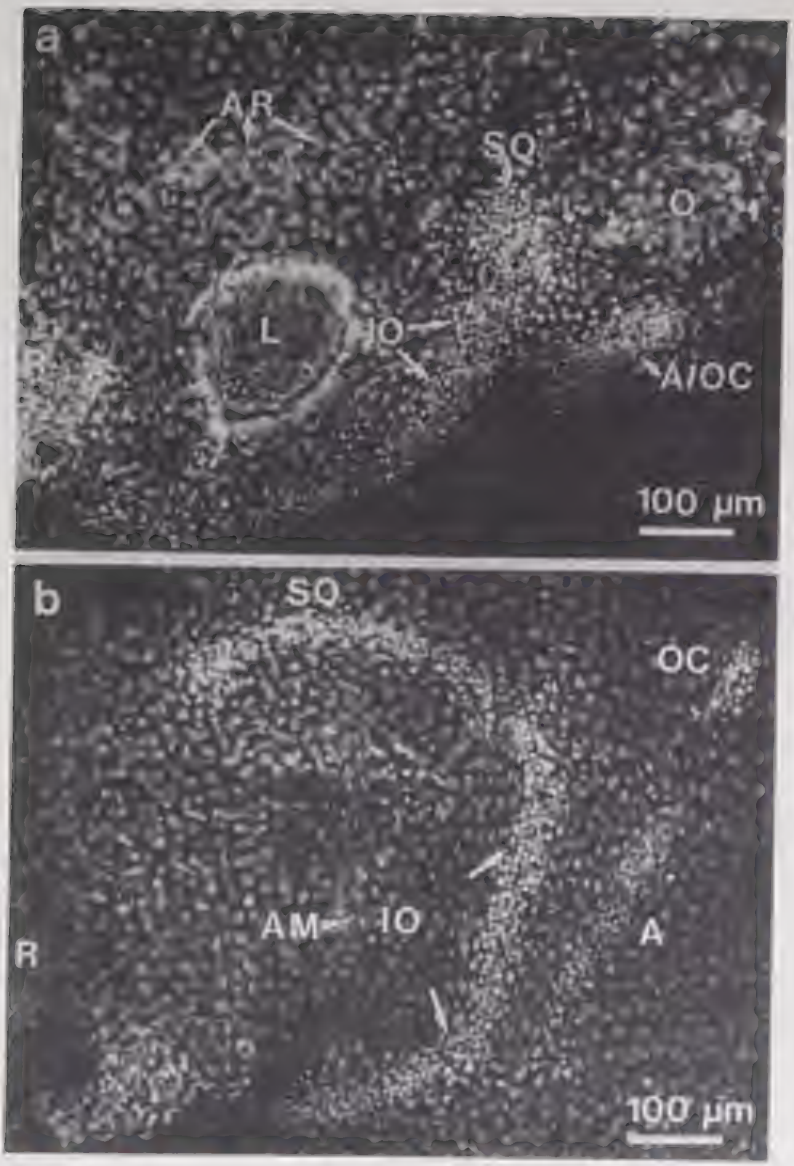

Abb. 4

Abb. 4. Hautpräparate von Embryonen der Stadien 33/34 (a) und 39 1/2 (b). Die Zellkerne wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI angefärbt. In jedem der beiden Präparate sind die Riechgrube (R) und das supraorbitale (SO), infraorbitale (IO), aortische (A) und occipitale (OC) Seitenlinienprimordium zu erkennen. In (a) können die Berührungsfläche zwischen Haut und Ohrbläschen (O), der an der Epidermis haftende Linsenrest (L) und der dorsale Augenrand (AR) als Orientierungspunkte dienen. In (b) ist der Augenmittelpunkt (AM) durch eine kleine Zellverdichtung gekennzeichnet.

ist, den Augenrand und die Stelle, an der das Ohrbläschen der Epidermis anliegt. Ventral vom Ohrbläschen liegen die Primordien der occipitalen und der aortischen Linie, manchmal so dicht beisammen, daß sie zu einem einzigen länglichen Primordium zu verschmelzen scheinen. Zwischen dem Ohrbläschen und dem hinteren Augenrand befinden sich ebenfalls zwei Primordien: das infraorbitale, das sich bereits ventrad zu verlängern beginnt, und, dorsal davon, das noch mehr oder weniger runde supraorbitale Primordium, dessen Schicksal im weiteren verfolgt werden soll.

In Abb. 5 ist die typische Abfolge der Veränderungen in diesem System dargestellt. Zwischen den Stadien 33/34 und 39 1/2 streckt sich das Primordium in die Länge. Dabei bleibt das hintere Ende an seinem Platz, dorsal vom Ausgangspunkt der infraorbitalen Linie, während das vordere Ende, dem Verlauf des dorsalen Augenrandes in einigem Abstand folgend, vorrückt. Das Primordium nimmt zwischen den Stadien 37/38 und 39 1/2 gewöhnlich einen keulenförmigen Umriß an. Es ist im vorderen Teil am breitesten und hat seine schmalste Stelle nahe dem Hinterende. An dieser Stelle kann das Primordium auch zeitweise unterbrochen erscheinen. Im Stadium 39 1/2 (Abb. 4b, Abb. 5) beginnt die typische Keulenform zu verschwinden, das Primordium ist hinter dem vordersten, immer noch etwas breiteren Teil mehr oder weniger gleichmäßig stark, und die ersten Anzeichen einer Segmentierung sind zu erkennen. Der Zerfall des Primordiums in mehrere, unterschiedlich große Fragmente ist im Stadium 40 deutlich ausgeprägt. Die größeren Fragmente zeigen manchmal Einschnü-

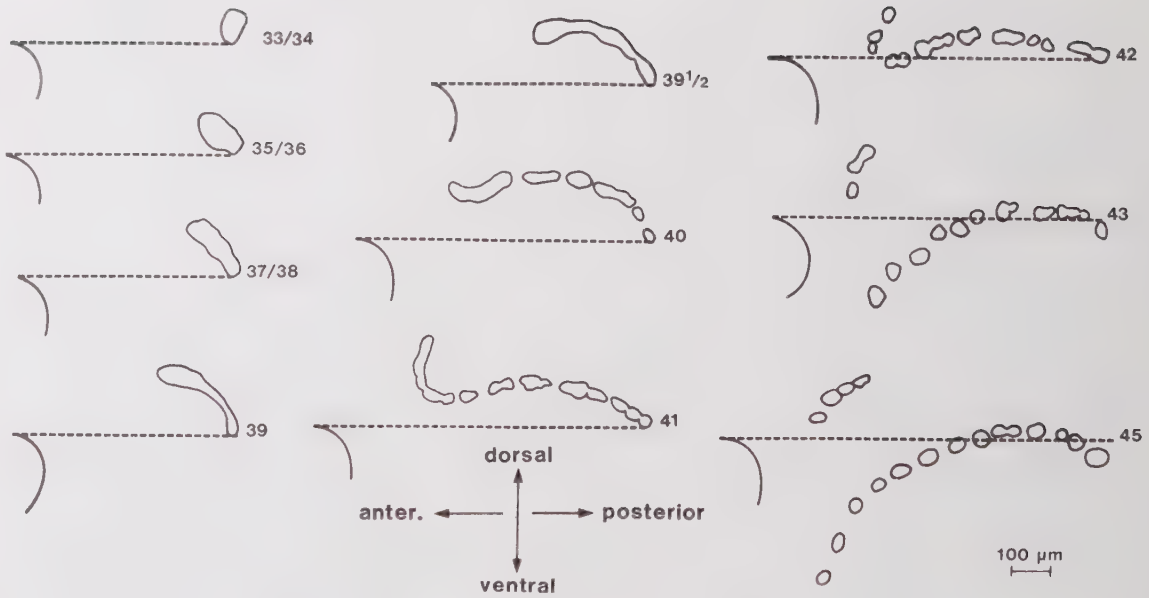
33/34
35/36
37/38
39
39 1/2
40
41
42
43
45
dorsal
anter.
posterior
ventral
100 µm

Abb. 5

Abb. 5. Entwicklung des supraorbitalen Seitenliniensystems. Der Umriß eines supraorbitalen Primordiums wurde zusammen mit dem hinteren Rand der Riechgrube von der Fotografie eines für das jeweilige Stadium repräsentativen Hautpräparates abgezeichnet. Die gestrichelte Bezugslinie verbindet den dorsalen Rand der Riechgrube mit dem hinteren Ende der supraorbitalen Linie, welches immer am vorderen Rand des Ohrbläschens verbleibt. Die Embryonalstadien nach Nieuwkoop und Faber (1967) sind angegeben.

rungen, das vorderste ist fast immer groß, ohne Einschnürung und leicht nach dorsal gebogen. Die Einschnürung der Fragmente und ihr Zerfall in kleinere Einheiten setzt sich in der weiteren Entwicklung fort, bis im Stadium 43 alle primären Organe eindeutig abzugrenzen sind. Aber viele Organe hängen noch zusammen, und erst im Stadium 47, drei Tage nach Beginn der Segmentierung, sind wirklich alle durch dazwischenliegende Epidermiszellen vollständig voneinander getrennt.

Zwischen Stadium 40 und 41 biegt der vorderste Teil des Primordiums etwa im rechten Winkel aus der bisherigen Richtung ab und verlängert sich eine kurze Strecke dorsad. Nach Stadium 42 wird dieser Teil des entstehenden Liniensystems vom größeren Rest getrennt. Er verbleibt in dorsaler Position und bildet die parietale Linie, während der vordere Teil der Hauptlinie, relativ zur Bezugslinie Ohr-Riechgrube (Abb. 5), ventrad verlagert wird, so daß eine beträchtliche Lücke zwischen beiden Organreihen entsteht. In seltenen Fällen kann die Ausbildung einer parietalen Linie unterbleiben. Ab Stadium 43 wird das hintere Ende der Hauptlinie allmählich ventrad eingekrümmt, bis im Stadium 47 1/2 die wenigen so verlagerten Organe über dem vorderen Rand des Ohrbläschens zu liegen kommen, wie man an Totalpräparaten entsprechender Larvenstadien erkennen kann (nicht gezeigt). Diese Organe entsprechen der vorderen auditorischen Gruppe von Shelton (1970). Der verbleibende Teil der Hauptlinie ist die supraorbitale Linie (Abb. 6).

Abb. 6

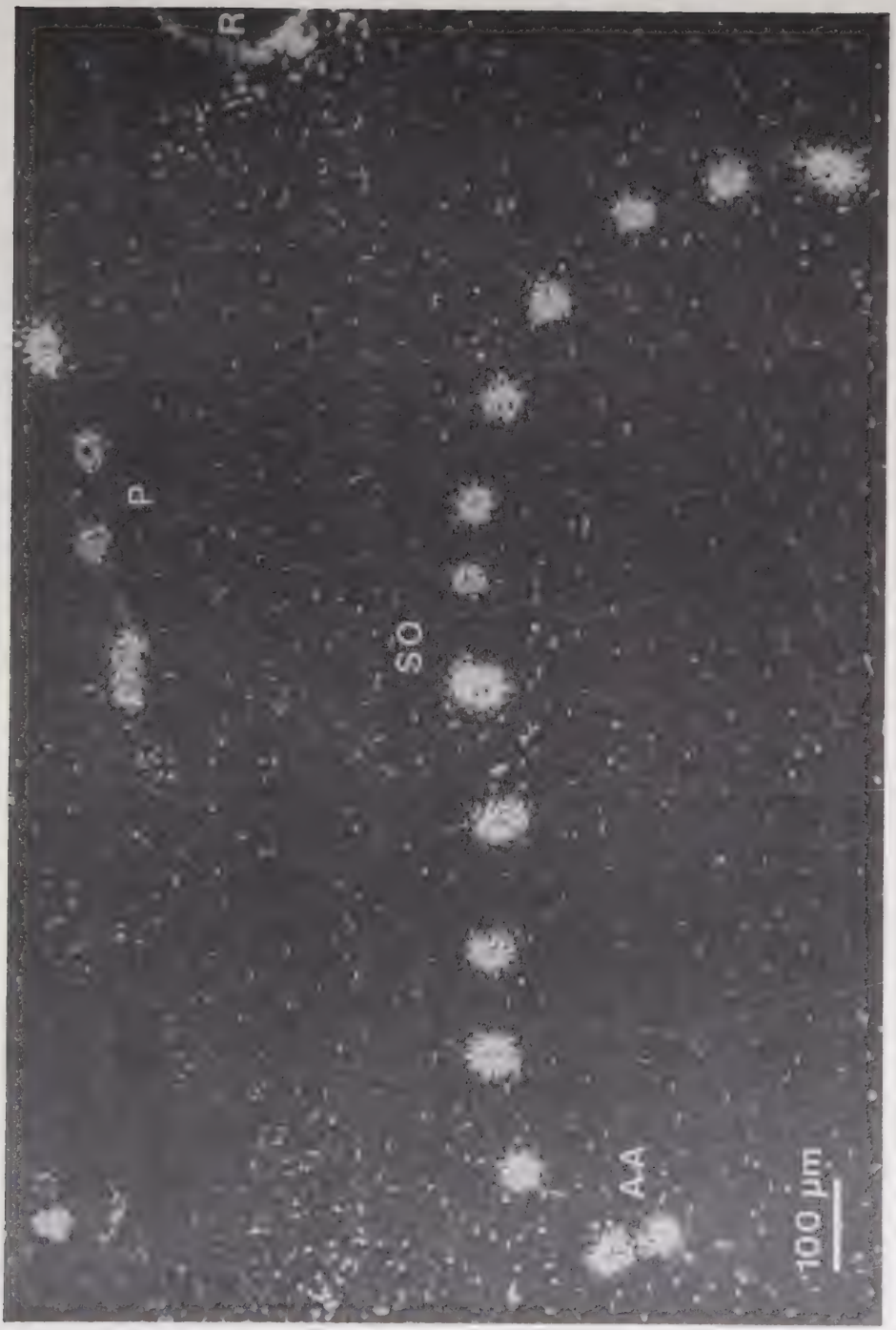

Abb. 6. Hautpräparat einer Larve des Stadiums 47 1/2. Man erkennt die Riechgrube (R), die anteriore auditorische Gruppe von Seitenlinienorganen (AA; den vorderen Rand des Ohrbläschens markierend), die supraorbitale Linie (SO) und, dorsal davon, die parietale Linie (P) von primären Seitenlinienorganen.

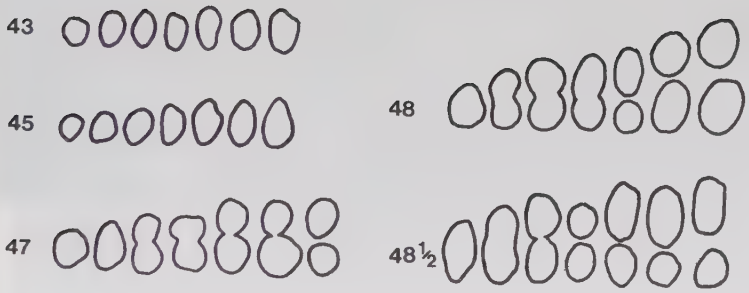

Abb. 7. Sekundäre Verlängerung der supraorbitalen Linie. Für die angegebenen Stadien wurde für je 7 ausgewählte supraorbitale Linien der Umriß des jeweils vordersten Organs nachgezeichnet. Man erkennt die fortschreitende Verlängerung, Einschnürung und Zweiteilung dieser Organe.

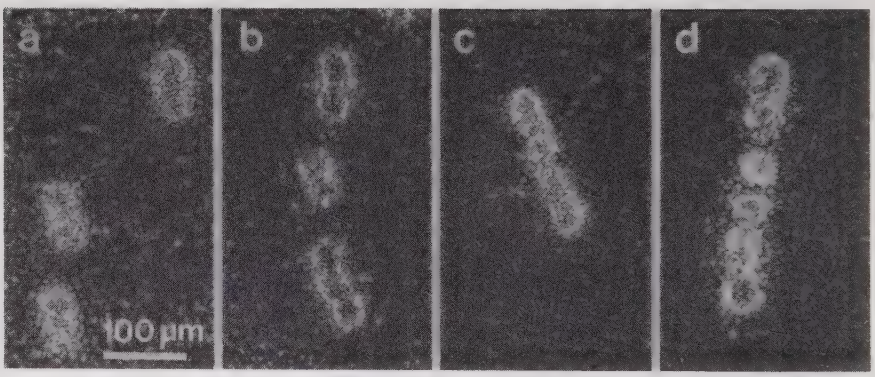

Abb. 8. Sekundäre Vermehrung der primären supraorbitalen Organe und die Entstehung von Plaques. (a) Drei sich in die Länge streckende primäre Organe des Stadiums 48 1/2 (10 Tage), (b) drei längsgestreckte primäre Organe, die bereits Einschnürungen senkrecht zur Längsachse erkennen lassen (Stadium 49, 12 Tage), (c) ein aus einem einzelnen primären Organ entstandener Plaque (Stadium 52, 21 Tage) und (d) ein großer Plaque von Organen in einer Kaulquappe des Stadiums 54 (26 Tage).

Abb. 9

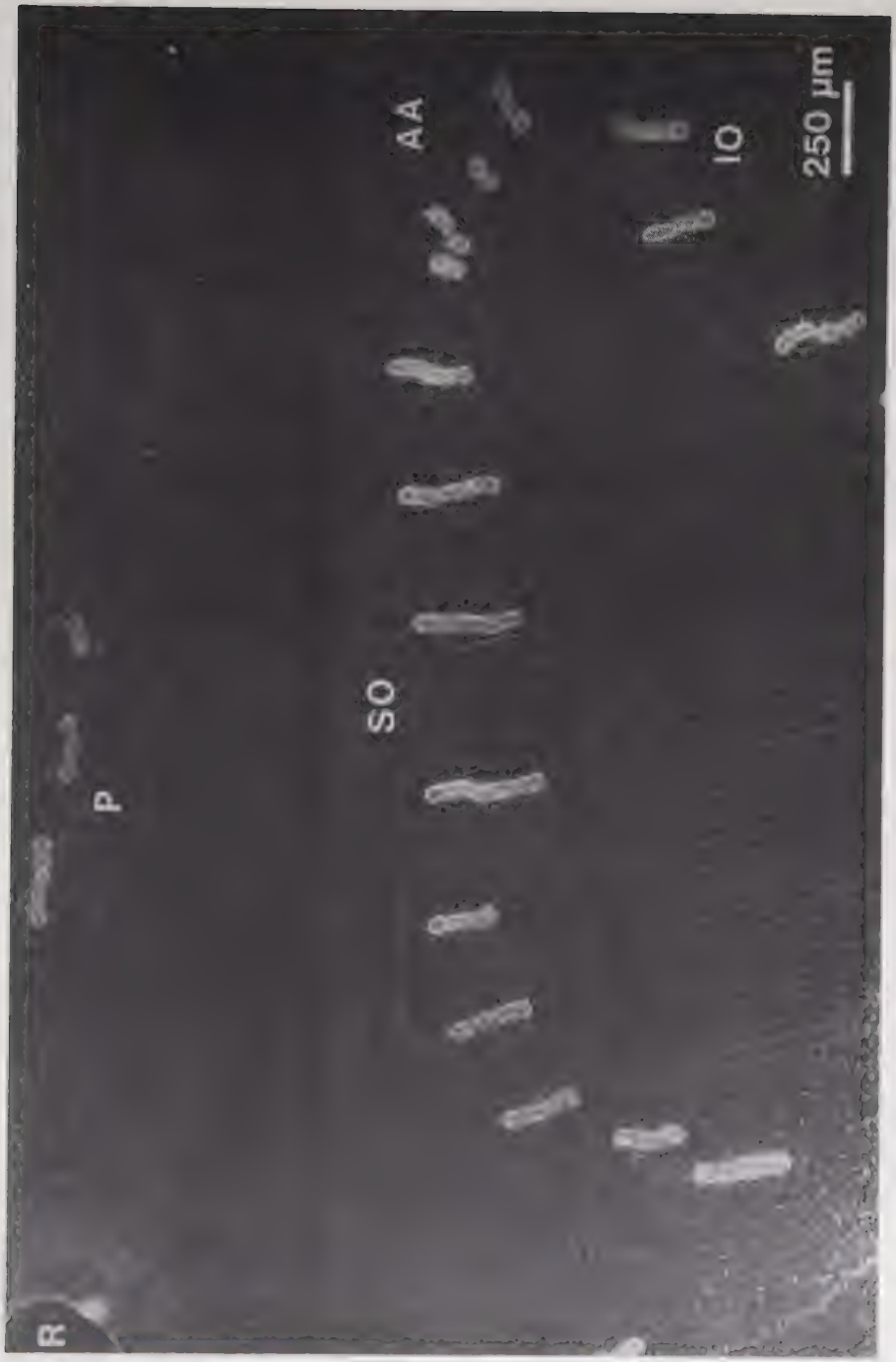

Abb. 9. Hautpräparat einer Larve des Stadiums 53. Man erkennt die Riechgrube (R), einen Teil der infraorbitalen Linie (IO), die anteriore auditorische Gruppe von Organen (AA; nicht deutlich gegen die supraorbitale Linie abgegrenzt), die supraorbitale Linie (SO) und, dorsal davon, die parietale Linie (P) von Seitenlinienorganen.

Nach Stadium 47 beginnt in etwa der Hälfte der Fälle das vorderste Organ der supraorbitalen Linie sich etwas in die Länge zu strecken, einzuschnüren und schließlich in zwei Tochterorgane aufzuteilen (Abb. 7), was zu einer, allerdings sehr geringfügigen, sekundären Verlängerung der Linie führt. Nach Stadium 48 wachsen die zuvor mehr oder weniger kreisrunden primären Organe in die Länge. Diese Längsstreckung erfolgt in der supraorbitalen Linie in dorsoventraler und in der parietalen Linie in rostrocaudaler Richtung. Im Stadium 49 sind aus einem langgestreckten primären Organ meist schon mehrere in einer Reihe dicht nebeneinander liegende Organe hervorgegangen. Eine solche Gruppe von Organen bezeichnet man als Plaque (Murray, 1955). Die Größe der Plaques und damit die Zahl der Organe pro Plaque nimmt stetig zu, und die Organe rücken allmählich ein wenig auseinander (Abb. 8, Abb. 9). Im Stadium 54 können bis zu 11 Organe in einem Plaque gefunden werden. Die weitere Entwicklung des Seitenliniensystems von Xenopus laevis wurde von Shelton (1970) beschrieben.

Zur Frage der Integration epidermaler Zellen in das Seitenliniensystem

Wie in der Einleitung erwähnt, stellten Harrison (1904) an Rana sylvestris und Stone (1933) an Ambystoma punctatum fest, daß an der Bildung des Seitenliniensystems nur primordiale Zellen beteiligt sind und epidermale Zellen nicht integriert werden. Um diese Aussage am supraorbitalen System von Xenopus zu überprüfen, wurden Transplantationen zwischen den nahe

verwandten Arten X. laevis und X. borealis durchgeführt. Zellkerne von X. borealis können nach Färbung mit einem DNA-bindenden fluoreszierenden Farbstoff am Vorhandensein einer Anzahl kleiner heterochromatischer Verdichtungen von X. laevis-Kernen unterschieden werden (Thiebaud, 1983). Transplantiert man im Stadium 22 ein Stück borealis-Epidermis in den voraussichtlichen Weg des supraorbitalen Primordiums, so sollten nach dem Einwandern in dieses Gebiet und nach der Organbildung in späteren Stadien auch in den Organen in borealis-Umgebung nur laevis-Zellen zu finden sein, falls sich epidermale Zellen nicht am Aufbau des supraorbitalen Systems beteiligen.

Die Epidermis von Xenopus-Larven besteht aus einer inneren und einer äußeren Zellschicht. Es zeigte sich, daß diese beiden Schichten aus unbekannten Gründen in einem borealis-Implantat nach einiger Zeit nicht mehr deckungsgleich sind. In den beiden Fällen der Abb. 10 ist daher die Ausdehnung des borealis-Implantats für beide Schichten gesondert dargestellt. Es wurde nie beobachtet, daß die von einem laevis-Primordium herstammenden Organe, die sich bis zum Stadium 47 1/2 entwickelt hatten, borealis-Zellen enthielten, wenn sie in der äußeren (Abb. 10a) oder inneren (Abb. 10b) Epidermisschicht von borealis-Zellen umgeben waren. Ein Beispiel für ein laevis-Organ in borealis-Umgebung zeigt Abb. 11. Dieses Ergebnis bestätigt die Aussagen der obengenannten Autoren, daß epidermale Zellen nicht in das Seitenliniensystem integriert und zu dessen Aufbau verwendet werden.

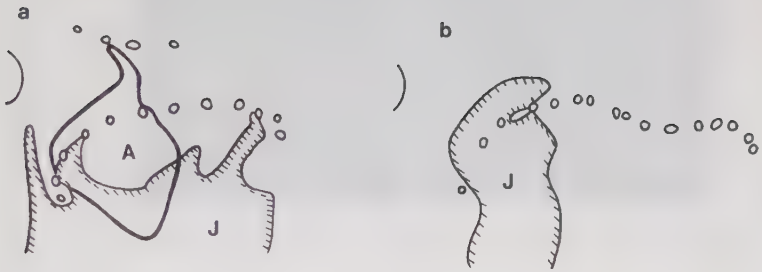

Abb. 10. Ergebnis der Transplantation von X. borealis-Epidermis in den künftigen Weg eines supraorbitalen Primordiums von X. laevis. Der Umriß des borealis-Implantats in der laevis-Epidermis ist für die innere (7777) und die äußere (——) Epidermisschicht getrennt eingezeichnet. Primordiale Zellen vom laevis-Typ sind in das borealis-Gebiet eingewandert und haben dort primäre Organe gebildet. Der hintere Rand der Riechgrube ist eingezeichnet. Fixierung der Larven erfolgte im Stadium 47 1/2.

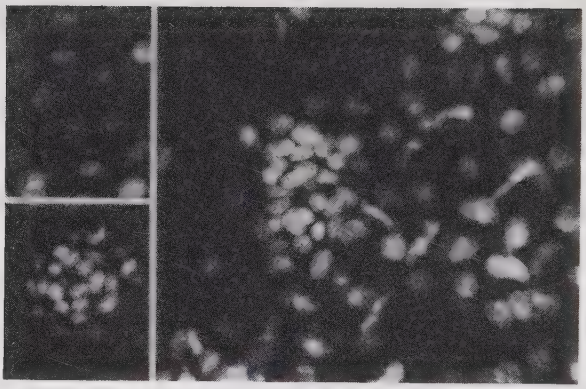

Abb. 11. Beispiel für ein supraorbitales Organ, das von einem laevis-Primordium herstammt und sich in implantierter borealis-Epidermis bis zum Stadium 47 1/2 entwickelt hat (mit DAPI gefärbtes Hautpräparat). Borealis-Zellkerne erkennt man am Vorkommen kleiner, hell leuchtender Flecken. Das Seitenlinienorgan enthält keine borealis-Zellen. Zum Vergleich: links oben laevis-Epidermis, links unten borealis-Organ. Insgesamt wurden 12 primäre supraorbitale Organe untersucht, die, von einem laevis-Primordium stammend, sich in implantierter borealis-Epidermis entwickelt hatten. In keinem der Organe wurden borealis-Zellen beobachtet.

Aktive Verlängerung und passive Streckung des supraorbitalen Primordiums

Die Gesamtlänge des supraorbitalen Primordiums nimmt im Laufe der Entwicklung beträchtlich zu. Grundsätzlich können zwei Vorgänge zu dieser Verlängerung beitragen: einerseits eine aktive Ausdehnung des Primordiums in Längsrichtung, zum anderen dessen passive Streckung durch das Wachstum der Epidermis, in die das Primordium eingebettet ist. Um den Anteil dieser beiden Prozesse an der Verlängerung des Primordiums zu bestimmen, wurde dessen Längenzuwachs mit dem Wachstum der Haut in Richtung des Primordiums verglichen (Abb. 12). Als ungefähres Maß für das Epidermiswachstum kann dabei die Verlängerung der Referenzlinie Ohr-Riechgrube der Abb. 5 dienen.

Zwischen den Stadien 33/34 und 39 1/2 nimmt die Länge des Primordiums mit einer Rate von 20 - 30 µm/h um etwa das Siebenfache zu. Die Epidermis wächst im gleichen Zeitraum nur um den Faktor 1,2. Daraus folgt, daß in dieser Phase die Verlängerung des Primordiums fast ausschließlich durch dessen aktive Ausdehnung bewirkt wird. Zwischen den Stadien 39 1/2 und 40 1/2 ist das Wachstum der Epidermis plötzlich erhöht. Gerade während dieser Zeit setzt die Fragmentierung des Primordiums ein (Abb. 5). Die weitere Verlängerung des Primordiums ist wegen der nun erfolgenden Abtrennung der parietalen Anlage schwierig zu beurteile. Läßt man der Einfachheit halber diesen parietalen Teil des Primordiums außer Betracht, d. h. subtrahiert man dessen Anteil von der

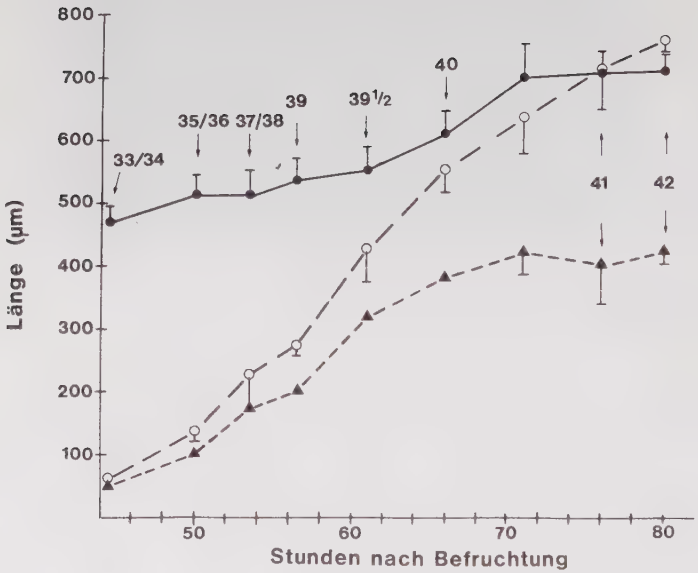
800
700
600
500
400
300
200
100
Länge (µm)
33/34
35/36
37/38
39
39½
40
41
42
50
60
70
80
Stunden nach Befruchtung

Abb. 12

Abb. 12. Längenzunahme des supraorbitalen Primordiums und Hautwachstum in der Ausdehnungsrichtung des Primordiums. An Hautpräparaten verschiedener Stadien wurde der Abstand zwischen dem Vorderrand des Ohrbläschens (d. i. dem Hinterende des supraorbitalen Primordiums) und dem hinteren Rand der Riechgrube parallel zur Bezugslinie der Abb. 5 gemessen. Die Zunahme dieses Abstandes wurde als Maß für das Hautwachstum genommen (geschlossene Kreise). In denselben Hautpräparaten wurde die Gesamtlänge des jeweiligen Primordiums bestimmt (offene Kreise). Zwischen den Stadien 40 1/2 und 42 konnte die Länge des supraorbitalen Primordiums ohne den parietalen Anteil direkt gemessen werden, für die vorhergehenden Stadien wurde die Gesamtlänge des Primordiums entsprechend verkürzt. Die so erhaltene Länge des Primordiums ohne parietalen Anteil wurde korrigiert für die passive Streckung des Primordiums durch das Hautwachstum, wobei angenommen wurde, daß diese Streckung proportional zur Länge des Primordiums ist (Dreiecke). Insgesamt wurden 51 Hautpräparate ausgewertet. Jeder Punkt stellt den Mittelwert aus 5 bis 6 Messungen dar; die jeweiligen Standardabweichungen sind als senkrechte Balken eingezeichnet. Die Embryonalstadien sind eingetragen (Pfeile).

Gesamtlänge des Primordiums, und korrigiert man die Längenzunahme um den Anteil, der auf das Hautwachstum zurückzuführen ist, so ergibt sich folgendes: das Primodium verlängert sich aktiv bis etwa zum Stadium 40, dann, nach dem Einsetzen der Fragmentierung, kommt diese Ausdehnung zum Stillstand. Der unfragmentierte parietale Teil des Primordiums bewegt sich zwischen Stadium 40 und 40 1/2 dorsad. Alle weiteren Änderungen des Verlaufs der supraorbitalen Linien sind dann möglicherweise verursacht durch passive Verlagerungen auf Grund differentiellen Epidermiswachstums.

Zum Mechanismus der aktiven Verlängerung des supraorbitalen Primordiums

In Abb. 13 wird der Längenzuwachs des Primordiums verglichen mit der vom Primordium jeweils bedeckten Fläche. Dabei gilt hier als Länge des Primordiums ab Stadium 40 die Summe der Längen der einzelnen Fragmente, im Gegensatz zum vorhergehenden Abschnitt, in welchem die Gesamtlänge des fragmentierten Primordiums, samt den Lücken zwischen den Fragmenten, gemessen wurde.

Sowohl die Länge des Primordiums als auch dessen Fläche nehmen linear zu. Aus dem konstanten Verhältnis zwischen Längen- und Flächenzuwachs ergibt sich, daß die Verlängerung des Primordiums im wesentlichen durch sein Flächenwachstum gegeben ist und nicht durch eine grundlegende Änderung der Form des Primordiums. Obwohl charakteristische Formänderungen während der Entwicklung zu beobachten sind (Abb. 5), bleibt die

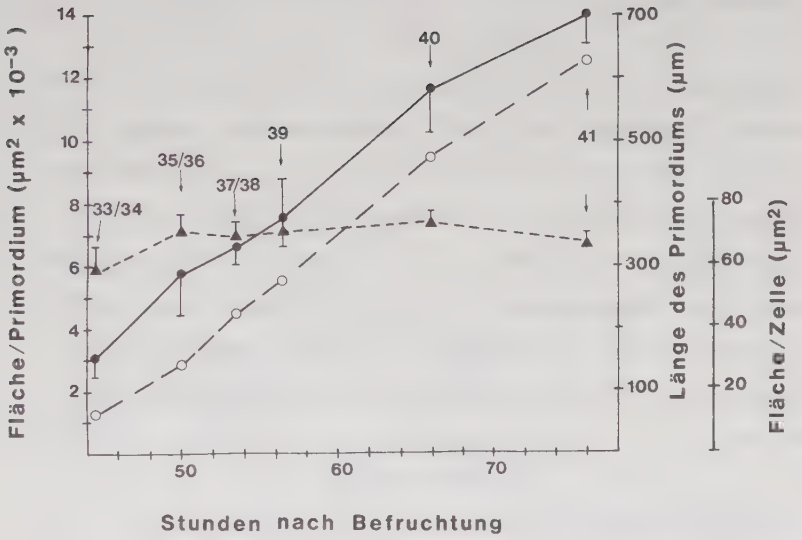

Abb. 13. Wachstum des supraorbitalen Primordiums. Aus den Fotografien der Hautpräparate wurde die Fläche pro Primordium bestimmt (geschlossene Kreise). Als Länge des Primordiums nach Stadium 39 wurde in diesem Fall die Summe der Längen der einzelnen primordialen Fragmente genommen (offene Kreise). Die im Durchschnitt von einer primordialen Zelle eingenommene Epidermisfläche wurde durch Teilung der Fläche des Primordiums durch die Zahl der primordialen Zellen errechnet (Dreiecke). Dieselben Hautpräparate wie in Abb. 12 wurden ausgewertet. Die Standardabweichungen sind als senkrechte Balken eingezeichnet. Die Embryonalstadien sind angegeben (Pfeile).

"durchschnittliche" Breite eines Primordiums etwa konstant, und eine Verlängerung ist von einem entsprechenden Flächenzuwachs begleitet.

Die Fläche, die im Durchschnitt von einer Zelle des Primordiums eingenommen wird, bleibt während dieser ganzen Zeit konstant bei etwa 70 μm^2/Zelle. Da das Primordium während seiner ganzen Entwicklung in Bezug auf die Zellanordnung einschichtig bleibt (Abb. 3), ist sein Flächenwachstum und damit sein Längenzuwachs durch die Rate der Zunahme seiner Zellzahl gegeben. Eine Größen- oder Formänderung seiner Zellen spielt für die Verlängerung des Primordiums keine Rolle.

Zur Topologie der Zellvermehrung

Die Transplantationsexperimente haben bestätigt, daß epidermale Zellen nicht in das auswachsende supraorbitale Primordium integriert werden. Eine Zunahme der Zellzahl muß daher allein auf Zellteilungen im Primordium beruhen. Dabei stellt sich die Frage, ob diese Zellteilungen auf eine bestimmte Wachstumszone beschränkt sind, z. B. das vordere Ende des Primordiums, oder ob teilungsaktive Zellen über das ganze Primordium verteilt vorkommen.

Um die räumliche Verteilung von primordialen Zellen zu bestimmen, die sich zu einem gegebenen Zeitpunkt in der S-Phase des Zellzyklus befinden und ihre DNA replizieren, wurden Embryonen verschiedenen Alters für 30 min in ^3H-

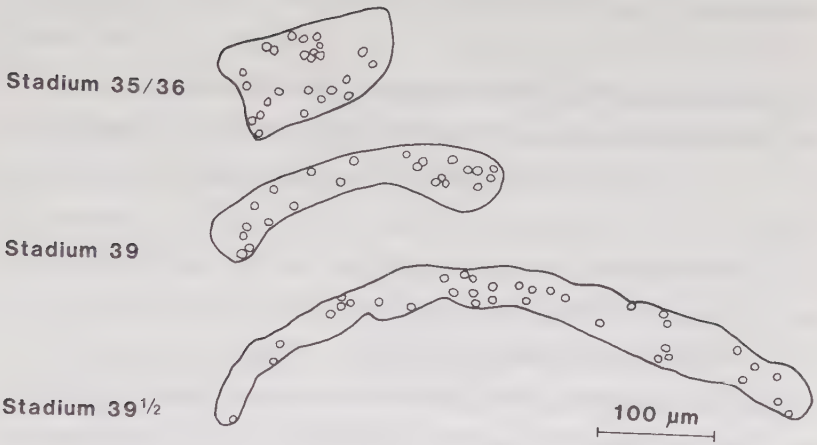

Abb. 14. Räumliche Verteilung von DNA-synthetisierenden Zellkernen im supraorbitalen Primordium. Nach 30 minütigem ^{3}H-Thymidinpuls und anschließender Autoradiografie markierte Zellkerne sind als Kreise eingetragen. Das anteriore Ende der Primordien zeigt nach rechts. Insgesamt wurden 9 Primordien auf diese Weise ausgewertet.

Thymidin inkubiert. Die Autoradiografie von Hautpräparaten solcher Tiere zeigt, daß markierte Zellkerne immer über das ganze jeweilige Primordium zufällig verteilt sind (Abb. 14).

2. Diskussion

Beschreibung der Normalentwicklung

Die Entwicklung des Seitenliniensystems von X. laevis wird bei Nieuwkoop und Faber (1967) kurz beschrieben. Veränderungen in diesem Organsystem während der Metamorphose wurden von Shelton (1970) untersucht. Für unsere Absicht, das Zusammenspiel verschiedener morphogenetischer Mechanismen bei der Entwicklung des Seitenliniensystems quantitativ und so vollständig wie möglich zu erfassen, erschien eine mehr ins einzelne gehende Beschreibung der Normalentwicklung besonders des supraorbitalen Systems wünschenswert als Voraussetzung für die weiteren Untersuchungen. Einige neue Ergebnisse wurden dabei gewonnen.

In der dorsalen Kopfregion vor dem Ohrbläschen unterscheidet Shelton (1970) bei X. laevis einen supraorbitalen Komplex von Organen, mit einer parietalen und einer supraorbitalen Linie, und eine anteriore auditorische Gruppe von Organen über dem vorderen Rand des Ohrbläschens. Bei Nieuwkoop und Faber (1967) wird die Bildung der supraorbitalen Linie knapp beschrieben; das Vorhandensein der parietalen Organe ab Stadium 45 wird festgestellt; eine anteriore auditorische Gruppe wird nicht erwähnt. Nach unseren Ergebnissen entstehen

alle diese Reihen oder Gruppen von Organen aus einem gemeinsamen, vor dem Ohrbläschen gelegenen Primordium. Der vorderste Teil des auswachsenden Primordiums biegt im Stadium 40 nach dorsal ab und wird zur parietalen Linie. Etwas später wird der hinterste Teil der supraorbitalen Linie ventrad verlagert, so daß einige Organe entlang dem vorderen Rand des Ohrbläschens zu liegen kommen. Es erscheint unnötig, diese Organe als eine eigene Gruppe - die anteriore auditorische Gruppe - zu behandeln, da sie einfach nur einen geringfügig umgelagerten Teil der supraorbitalen Linie darstellen, der selten scharf vom Rest der Linie abzugrenzen ist.

In den älteren Arbeiten zur Entwicklung des Seitenliniensystems wurden meist die mittlere und die obere laterale Linie genauer untersucht, die seitlich am Rumpf und bis in den Schwanz hinein verlaufen. Dabei wurde beobachtet, daß ein wanderndes Primordium ständig einzelne Organe an seinem hinteren Ende abschnürt und auf seinem Weg zurückläßt, bis das Zellmaterial des Primordiums aufgebraucht ist (Harrison, 1904; Stone, 1933). Diese Art der Organbildung wurde auch von uns an den lateralen Linien von Xenopus beobachtet (unveröffentlicht). Am supraorbitalen System ist eine solche Gleichzeitigkeit des primordialen Auswachsens und der Organbildung nicht ausgeprägt. Falls auch dieses Primordium von seinem hinteren Ende her fortschreitend in Organe eingeteilt wird, so muß dies rasch geschehen im Verhältnis zur Verlängerungsrate des Primordiums. Im Stadium 39 1/2 sind die ersten schwachen Anzeichen einer Aufteilung des Primordiums in kleinere Einheiten zu erkennen. Bereits 5 Stunden

später, im Stadium 40, ist der größte Teil des Primordiums bis auf den vordersten, den künftigen parietalen Teil, in Fragmentierung begriffen, und die aktive Verlängerung kommt zum Stillstand. Nur die nach Stadium 40 noch erfolgende Bewegung der parietalen Anlage nach dorsal und die anscheinend verzögerte Fragmentierung in diesem Teil des Primordiums erinnert an die Art und Weise der Organbildung in den lateralen Linien.

Wächst der Schwanz einer Amphibienlarve in die Länge, so wird auch die darauf verlaufende laterale Linie von Seitenlinienorganen durch Hinzufügen neuer Organe verlängert. Stone (1933) zeigte, daß dies auf einen Knospungsvorgang zurückzuführen ist, bei dem das hinterste Organ der Linie ein Organ weiter nach hinter zur Schwanzspitze hin abgibt, welches wieder ein weiteres Organ liefert usw. Dieser Vorgang der sekundären Verlängerung einer Linie konnte auch in der supraorbitalen Linie beobachtet werden, wo er allerdings wesentlich weniger deutlich ausgeprägt ist. Etwa jede zweite supraorbitale Linie verlängert sich um meist nur ein Organ, so daß zwischen den Stadien 47 und 49 die durchschnittliche Organzahl pro Linie um ungefähr ein halbes Organ zunimmt (siehe Teil II).

Nach Stadium 48 wächst jedes primäre Organ der supraorbitalen Linie in die Länge und teilt sich in mehrere Organe auf, die in einer Reihe dicht nebeneinander liegen und einen Plaque bilden. Ein ähnlicher Vorgang ist auch von anderen Amphibienarten bekannt: die Knospung von "akzessorischen" Organen aus

primären. Die Zahl der akzessorischen Organe, die von einem einzelnen primären Organ gebildet werden können, variiert und ist artspezifisch, z. B. 1 - 2 bei Ambystoma punctatum, 4 - 6 bei A. tigrinum, 6 und mehr bei Rana palustris und Hyla crucifer (Stone, 1937). Bei X. laevis wurden bis zu 11 Organe in einem Plaque gefunden.

Zellbewegungen und die Verlängerung des Primordiums

Die Seitenlinienprimordien bewegen sich in der Epidermis zwischen der Basalmembran und der äußeren epidermalen Zellschicht, wobei die Zellen der inneren Epidermisschicht beiseite geschoben werden. Die äußere Epidermisschicht wird dabei durch das wandernde Primordium deformiert, aber ihr Zellverband bleibt erhalten, und die Epidermiszellen schließen als dünne Schicht das Primordium gegen das Außenmedium ab. Erst später, während ihrer Ausdifferenzierung, durchbrechen die primären Organe die äußere Epidermisschicht (Stone, 1933).

Frühere Autoren (Harrison, 1904; Stone, 1933; Wright, 1947) stellten übereinstimmend fest, daß bei Amphibien epidermale Zellen keinen Beitrag zum Aufbau des Seitenliniensystems leisten; alle Zellen dieses Systems sollen von den Primordien herstammen, nachdem diese einmal aus den epidermalen Plakoden entstanden sind. Die Ergebnisse unserer Transplantations-experimente stimmen mit dieser Ansicht überein. Wandert ein X. laevis-Primordium in implantierte X. borealis-Epidermis ein, so bildet es in der borealis-Umgebung primäre Organe, ohne borealis-Zellen zu deren Aufbau zu verwenden. Dies

zeigt, daß das supraorbitale Primordium sich aktiv in der Epidermis bewegt, und daß primordiale Zellen die einzige Materialquelle für den Aufbau des Systems sind.

Zwei Vorgänge können zur Verlängerung des supraorbitalen Primordiums beitragen: eine aktive Ausdehnung des Primordiums in Längsrichtung und dessen passive Streckung durch das Wachstum der umgebenden Epidermis. Um den Anteil dieser beiden Mechanismen an der gesamten Verlängerung des Primordiums zu bestimmen, wurde dessen Längenzuwachs mit dem Hautwachstum in Richtung des Primordiums verglichen. Dabei zeigte sich, wie erwartet (z. B. Abb. 5), daß zwischen den Stadien 33/34 und 39 1/2 fast nur die aktive Ausdehnung des Primordiums zu dessen Verlängerung beiträgt. Nach Stadium 40 bewegt sich der vorderste Teil des Primordiums dorsad, allem Anschein nach durch aktive Wanderung. Läßt man der Einfachheit halber diesen Teil der Linie außer Betracht und korrigiert den Längenzuwachs des Restprimordiums um die geschätzte passive Streckung, so zeigt sich, daß die aktive Ausdehnung der supraorbitalen Linie im Stadium 40, mit Beginn der Fragmentierung, zum Stillstand kommt.

Die Fragmentierung selbst mag, zumindest teilweise, durch eine passive Streckung des Primordiums herbeigeführt werden. Die Länge des Primordiums, gemessen als Summe der Fragmentlängen, d. h. ohne die Lücken zwischen den Fragmenten, nimmt linear zu. Um die Entstehung dieser Lücken zu ermöglichen, muß die Gesamtlänge des Primordiums zwischen den Stadien 39 1/2 und 41 beschleunigt zunehmen, was in der Tat zu

beobachten ist. Gerade während dieses Zeitraums aber ist auch das Hautwachstum in Richtung des Primordiums beschleunigt (Abb. 12).

Weitere Veränderungen in der Anordnung der Teile des supraorbitalen Systems sind wahrscheinlich ebenso auf passive Verlagerungen zurückzuführen. Man betrachte z. B. die Entstehung der Lücke zwischen der parietalen und dem vorderen Teil der supraorbitalen Linie nach Stadium 42 (Abb. 5). Offensichtlich entsteht diese Lücke dadurch, daß die vorderen supraorbitalen Organe ventrad verlagert werden, während die parietalen Organe, im Verhältnis zur Bezugslinie Nase-Ohr, an ihrem Platz bleiben. Bei aktiver Wanderung in der Epidermis müßten die einzelnen Organe sich sehr gut aufeinander abgestimmt bewegen, parallel zueinander und mit so genau aufeinander bezogenen Geschwindigkeiten, daß während des gesamten Bewegungsvorgangs die einfache und regelmäßige Form der Linie erhalten bleibt. Dies scheint weniger wahrscheinlich als die Annahme, daß differentielles Hautwachstum in der Kopfregion zur Umlagerung der Organe führt. Wegen der ausgeprägten Verbreiterung des Kaulquappenkopfes auf Augenhöhe muß gerade zu dieser Zeit ein solches Hautwachstum stattfinden. Da jedoch geeignete Markierungspunkte in dieser Epidermisregion selten sind, ist es schwierig, die Wachstumsbewegungen der Epidermis im einzelnen zu verfolgen.

Es sind verschiedene Möglichkeiten denkbar, um eine kompaktere vielzellige Struktur in einen langgestreckten Zellstrang zu überführen. Veränderungen in der Anordnung der Zellen, der

Zellgröße, Zellform oder Zellzahl können einzeln oder in verschiedenen Kombinationen eine solche Längsstreckung ermöglichen. So wird z. B. die Verlängerung des Urnierenganges im Axolotl begleitet von einer Änderung der räumlichen Anordnung seiner Zellen, deren Zahl dabei ungefähr gleich bleibt (Poole und Steinberg, 1981). Änderungen der Zellgröße und -form tragen zur Verlängerung der Chorda dorsalis von Urodelen bei (Mookerjee et al., 1953). Im Falle des supraorbitalen Primordiums von Xenopus ist die Zunahme der Zellzahl von hauptsächlicher Bedeutung.

Das supraorbitale Primordium bleibt während der ganzen Phase seiner aktiven Verlängerung einschichtig (Abb. 3). Sein Längenzuwachs ist dabei immer proportional zu seinem Flächenzuwachs. Da die Fläche pro Zelle aber gleich bleibt, Veränderungen der Zellgröße oder -form also anscheinend keine wesentliche Rolle spielen, muß die Zellzahl im Primordium entsprechend zunehmen. Eine Umordnung von Zellen innerhalb des sich in seiner Form charakteristisch ändernden Primordiums mag vorkommen, doch dies scheint für die schließlich erreichte Länge des Primordiums nicht von Bedeutung zu sein. Ob die Zunahme der Zellzahl tatsächlich die treibende Kraft bei der Verlängerung des Primordiums ist, ob z. B. einfach das Auffüllen eines vorgeformten, begrenzten Epidermisbereichs mit Zellen vom hinteren Ende her zur Verlängerung führt, kann aufgrund unserer bisherigen Ergebnisse noch nicht schlüssig beantwortet werden. Die charakteristische Abfolge von Gestaltänderungen während des Auswachsens eines supraorbitalen Primordiums spricht eigentlich gegen eine solche Annahme und

deutet eher auf einen Mechanismus, bei dem aktive Zellwanderung eine Rolle spielt.

Aus den Transplantationsexperimenten folgt, daß die Zunahme der Zellzahl über Zellteilungen im Primordium erfolgen muß. Nach den Ergebnissen der autoradiographischen Untersuchung sind DNA-synthetisierende Zellen über das ganze Primordium verteilt. Es gibt also keine Wachstumszone, z. B. am vorderen Ende des auswachsenden Primordiums, wo diese Zone vorrücken könnte, indem laufend Zellen, die unbeweglich sein dürften, nach hinten abgegeben werden. Wenn Zellteilungen gleichmäßig verteilt vorkommen, müssen alle primordialen Zellen während des Auswachsens ihre Position in der Epidermis ändern, mit Ausnahme der an hinterster Stelle gelegenen. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt dabei von der Lage der Zellen im Primordium ab. Die Maximalgeschwindigkeit, an dessen vorderem Ende, beträgt 20 - 30 µm/h und liegt damit innerhalb des weiten Bereichs bekannter Wanderungsgeschwindigkeiten von Amphibienzellen in vivo, der z. B. von 2 µm/h für Melanozyten von Triturus alpestris (Epperlein und Claviez, 1982) bis zu 700 µm/h für larvale Epidermiszellen während des Wundverschlusses bei Xenopus laevis (Radice, 1980) reicht.

Nach Trinkaus (1976) kann sich eine Gruppe von Zellen fortbewegen, indem entweder jede einzelne Zelle wandert, in loser Verbindung mit ihren Nachbarzellen, oder indem ein epithelialer Zellverband sich ausdehnt. Hat dieser Zellverband einen freien Rand, so erfolgt seine Ausdehnung in der Regel durch die Wanderungsaktivität der Randzellen, und die

im Innern des Verbandes liegenden Zellen werden passiv mitbewegt. Welche der Möglichkeiten im Falle des supraorbitalen Primordiums von Xenopus laevis verwirklicht ist, kann aus unseren Beobachtungen nicht abgeleitet werden.

Wenigstens einige der noch offenen Fragen zur Zellbewegung können mit geeigneten Methoden wahrscheinlich erfolgreich angegangen werden. In den folgenden Abschnitten sollen aber zunächst die Möglichkeiten der bisher angewandten beschreibenden und quantifizierenden Vorgehensweise ausgeschöpft werden, insbesonders um Aufschlüsse über das Wachstum, die Zellvermehrung und deren Zusammenhang mit der Organbildung, und die Prinzipien der Musterbildung in diesem System zu gewinnen.

II. Wachstum, Zellteilung und Organbildung im supraorbitalen Seitenliniensystem

1. Ergebnisse

Kinetik der Zellvermehrung

An Hautpräparaten von Embryonen und Larven, deren jeweiliges Entwicklungsstadium sorgfältig bestimmt worden war, wurde die Entwicklung der Gesamtzellzahl des supraorbitalen Systems zwischen den Stadien 33/34 und 49 verfolgt. Die Zellzahl nimmt im Beobachtungszeitraum stetig zu; diese Zunahme zeigt einen biphasischen Verlauf (Abb. 15a, geschlossene Kreise). Zwischen den Stadien 33/34 und 47 1/2 steigt die Zellzahl von 55 auf 580 Zellen an. Dieser Anstieg erfolgt nicht exponentiell, sondern linear, mit einer Rate von 4,6 Zellen/h. Nach Stadium 47 1/2 erhöht sich die Zellvermehrungsrate statistisch signifikant auf 7,3 Zellen/h. Wegen der starken Anhäufung der Zellen in den knospenden Organen wird eine genaue Bestimmung der Zellzahlen ab Stadium 49 schwierig. Die Linearität des zweiten Teils der Kurve, zwischen den Stadien 47 1/2 und 49, ist wegen des nur etwa dreifachen Anstiegs der Zellzahl unsicher.

Kaulquappen von X. laevis beginnen gewöhnlich im Alter von etwa 4 Tagen, Nahrung aufzunehmen (Nieuwkoop und Faber, 1967). Ungefütterte Larven können aber lange Zeit - nach eigenen Beobachtungen länger als 20 Tage - überleben. Sie entwickeln sich zunächst normal. Zwischen den Stadien 47 und

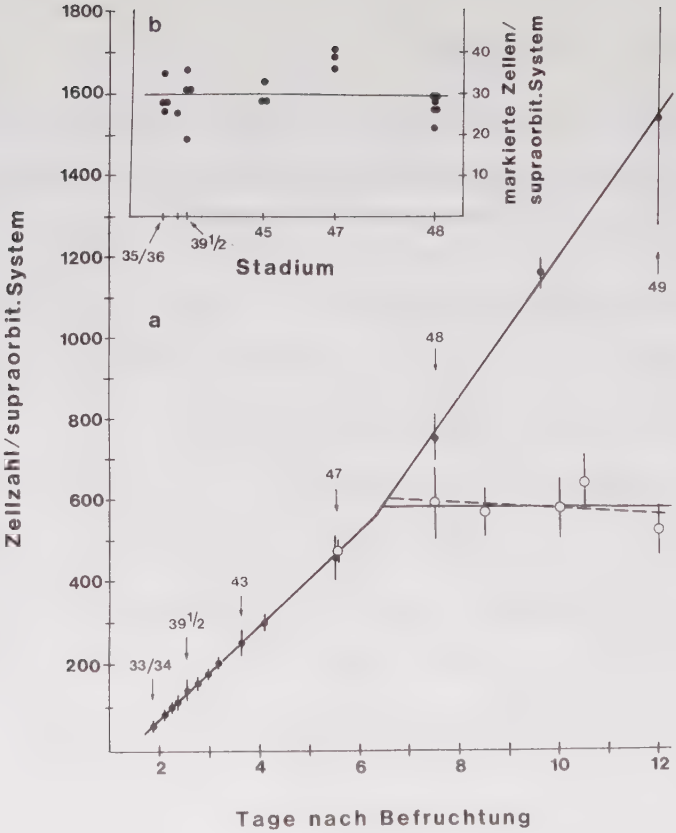
b
a
Zellzahl/supraorbit.System
markierte Zellen/ supraorbit.System
Stadium
35/36
39 1/2
45
47
48
49
33/34
43
Tage nach Befruchtung
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
40
30
20
10
2
4
6
8
10
12

Abb. 15

Abb. 15. Kinetik der Zellvermehrung im supraorbitalen System. (a) An Hautpräparaten von Embryonen und Larven, deren Entwicklungsstadium (Pfeile) sorgfältig bestimmt worden war, wurden die Zellen des supraorbitalen Systems für verschiedene Stadien ausgezählt. Für gefütterte Larven ergibt sich eine biphasische Wachstumskurve (geschlossene Kreise). Die Regressionsgerade besitzt eine Steigung von 4,6 Zellen/h zwischen Stadium 33/34 und 47 (Korrelationskoeffizient $r = 0,99$) und eine von 7,3 Zellen/h zwischen Stadium 48 und 49 (Korrelationskoeffizient $r = 0,90$). Der Unterschied zwischen den Steigungen ist statistisch signifikant (Signifikanzniveau $\alpha = 0,01$). In ungefütterten Larven erreicht die Zellzahl nach Stadium 47 ein Plateau (offene Kreise). Die Regressionsgerade hat eine leicht negative Steigung von -0,27 Zellen/h (Korrelationskoeffizient $r = -0,13$) zwischen dem 7. und dem 12. Tag (gestrichelte Linie). Diese Steigung ist aber nicht signifikant verschieden (Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$) von Null (durchgezogene Linie). Insgesamt wurden 128 Hautpräparate ausgewertet. Jeder Punkt stellt den Mittelwert aus 5 bis 6 (geschlossene Kreise) oder etwa 8 (offene Kreise) Messungen dar. Die Standardabweichungen sind als senkrechte Balken eingezeichnet. (b) Zahl der DNA-synthetisierenden Zellkerne im supraorbitalen System in verschiedenen Entwicklungsstadien. Nach einem 30 minütigen ^{3}H-Thymidinpuls und anschließender Autoradiografie wurde die Zahl der markierten Zellkerne pro supraorbitalem System bestimmt. Jeder Punkt stellt einen Meßwert dar. Die Steigung der Regressionsgeraden ist -0,004 Zellen/h (Korrelationskoeffizient $r = -0,04$).

48, im Alter von 6 bis 7 Tagen, kommt die Entwicklung aber, beurteilt nach den Kriterien der Normaltafel von Nieuwkoop und Faber (1967), zum Stillstand. Dieser Stillstand zeigt sich auch in der Zellvermehrungskurve des supraorbitalen Systems solcher Larven (Abb. 15, offene Kreise). Im Stadium 47 ist noch kein Unterschied in der Zellzahl zwischen gefütterten und ungefütterten Larven zu sehen. In ungefütterten Kaulquappen nimmt die Zellzahl aber ab dem 7. Tag nicht mehr zu. Er scheint, als ob in diesen Tieren das supraorbitale System nicht mehr in die zweite, durch eine höhere Zuwachsrate gekennzeichnete Wachstumsphase eintreten könne und statt dessen am Übergangspunkt zwischen den beiden Phasen stehen bleibe, bei einer Zellzahl von 579 ± 77 Zellen.

DNA-synthetisierende Zellen im supraorbitalen System

Um DNA-synthetisierende Zellen im supraorbitalen System zu markieren, wurden Embryonen und Larven verschiedenen Alters für 30 min in ^{3}H-Thymidin inkubiert. Die Autoradiografien von Hautpräparaten solcher Tiere wurden quantitativ ausgewertet (Abb. 15b). Dabei zeigte sich, daß die durchschnittliche Zahl der Zellen im supraorbitalen System, die sich zu einem gegebenen Zeitpunkt gerade in der S-Phase des Zellzyklus befinden, zwischen den Stadien 35/36 und 48 gleich bleibt, obwohl die Gesamtzahl der Zellen um mehr als das 10fache zunimmt. Im Durchschnitt werden, unabhängig vom Entwicklungsstadium, 29,6 ± 5,4 markierte Zellen pro supraorbitalem Seitenliniensystem gefunden.

Die Anzahl der supraorbitalen Organe

Zwischen dem Stadium 43, in dem die einzelnen Organe zum ersten Mal verläßlich gegeneinander abzugrenzen sind, und dem Stadium 47 bleibt die Gesamtzahl der Organe, die aus einem einzigen Primordium entstanden sind, gleich, bei einem Durchschnittswert von 16,4 ± 1,5 Organen pro System. Wegen der gelegentlichen Vermehrung der Organe durch die Knospung des vordersten Organs der supraorbitalen Linie (Teil I) steigt dieser Wert zwischen den Stadien 47 und 48 auf 17,1 ± 1,5 Organe. Die Zahl der parietalen Organe bleibt dabei gleich, bei 3,0 ± 0,8 (Ergebnisse von 77 Hautpräparaten). Besonders in der parietalen Linie und im vorderen Teil der supraorbitalen Linie wird es wegen der Bildung akzessorischer Organe in mehr als 10 Tage alten Larven schwierig, die Zahl der ursprünglich vorhandenen primären Organe genau zu bestimmen.

Zur Frage des klonalen Ursprungs primärer Seitenlinienorgane

Setzt man Eier von X. laevis 20 min nach ihrer Befruchtung einer erhöhten Temperatur aus, so entwickeln sich aus einigen dieser Eier haploid-triploide Chimären (Jacobson und Hirose, 1978). Haploide und triploide Zellen können aufgrund ihres spezifischen Kernvolumens unterschieden werden (Fankhauser, 1945). In der Epidermis solcher Chimären findet man oft Bereiche, in denen haploide und triploide Zellen nebeneinander vorkommen (Fischberg, 1949). Wenn ein supraorbitales Seitenlinienprimordium in einer solchen Region entsteht, so findet

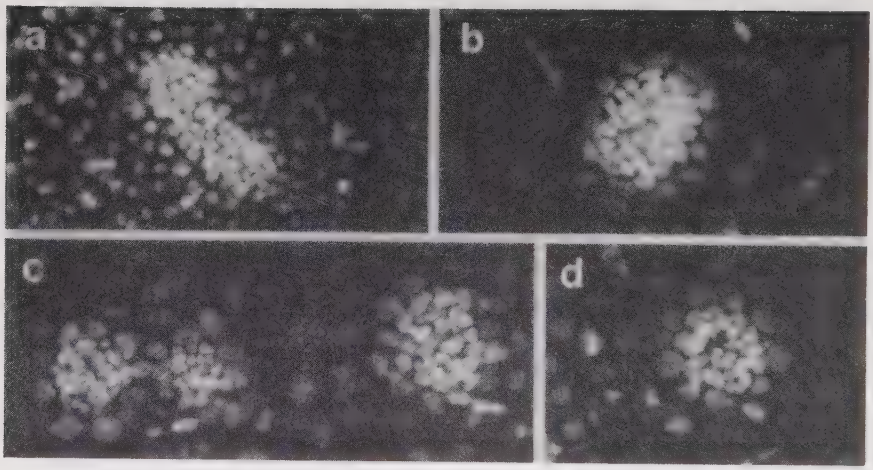

Abb. 16. Supraorbitale Seitenlinienorgane aus haploid-triploiden Chimären. Haploide (a) und triploide (b) epidermale und Seitenlinienzellen können in DAPI-gefärbten Hautpräparaten (Stadium 47 1/2) aufgrund ihrer Kerngröße unterschieden werden. In Chimären, bei denen sich am Entstehungsort der Seitenlinienplakoden in der Epidermis ein Gemisch aus haploiden und triploiden Zellen befindet, können Seitenlinienorgane entstehen, die sowohl haploide als auch triploide Zellen enthalten (c, d).

Abb. 17. Supraorbitale Seitenlinienorgane aus X. laevis-X. borealis-Chimären. Wenn die Grenze eines borealis-Implantats in der Epidermis zur Zeit der Bildung der Seitenlinienplakoden in der Ohrgegend verläuft, so können im Stadium 47 Seitenlinienorgane gefunden werden, die, umgeben von laevis-Epidermiszellen, sowohl laevis-Zellen als auch borealis-Zellen (schraffiert) enthalten. Borealis-Zellkerne können in DAPI-gefärbten Hautpräparaten am Vorkommen kleiner, hell fluoreszierender Heterochromatinklümpchen erkannt werden.

man häufig unter den daraus hervorgegangenen primären Organen solche, in denen haploide und triploide Zellen nebeneinander vorkommen (Abb. 16). Diese Beobachtung schließt einen klonalen Ursprung sowohl des Primordiums als auch der einzelnen Organe aus.

Wird die im Teil I beschriebene Transplantation eines Epidermisstücks von X. borealis auf X. laevis im Stadium 22 so ausgeführt, daß eine der Grenzen des Implantats in der zukünftigen Ohrgegend verläuft, so findet man im Stadium 47 1/2 manchmal in reiner laevis-Umgebung primäre Organe, in denen borealis- und laevis-Zellen nebeneinander vorkommen (Abb. 17). Beide Arten von Beobachtungen zeigen also den nicht-klonalen, mehrzelligen Ursprung sowohl des supraorbitalen Primordiums als auch der einzelnen Organe.

Die Divergenz der Organ- und Plaquegrößen

Eine auffällige Eigenschaft des Seitenliniensystems ist die starke Heterogenität in der Größe der primären Organe bzw. der daraus entstehenden Plaques. Das Ausmaß dieser Heterogenität, gemessen als der Unterschied in der Zellzahl zwischen dem kleinsten und dem größten Organ, das je in den Hautpräparaten eines Stadiums gefunden wurde, nimmt im supraorbitalen System gefütterter Larven mit der Zeit zu (Abb. 18).

Zwischen dem Stadium 43, in dem die einzelnen Organe zum ersten Mal eindeutig gegeneinander abzugrenzen sind, und dem

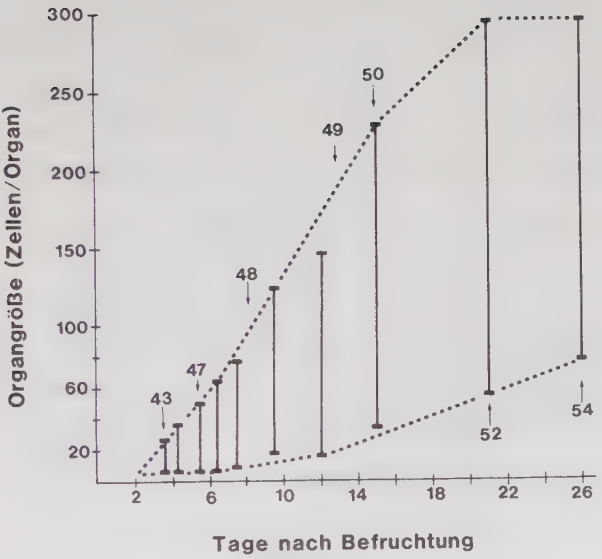

Abb. 18. Divergenz der Organ- und Plaquegrößen. Die Spanne der Organgrößen in einem bestimmten Entwicklungsstadium (Pfeile) ist durch einen senkrechten Balken dargestellt, dessen Endpunkte das größte bzw. kleinste Organ angeben, das je in einem Hautpräparat des betreffenden Stadiums gefunden wurde. In der Angabe für das Stadium 47 1/2 sind die Werte aller ungefütterten Larven, die nach dem 7. Tag fixiert wurden, enthalten, da die Organe in solchen Larven nicht mehr weiter wachsen und auf der Größe des Stadiums 47 1/2 stehen bleiben.

Stadium 47 1/2 bleibt die Größe der kleinsten Organe gleich, bei 6 bis 7 Zellen pro Organ. Die größten Organe wachsen dagegen von 26 auf 65 Zellen pro Organ. Nach Stadium 47 1/2 nehmen auch die kleinsten Organe an Größe zu, zuerst langsam, dann deutlicher, bis sie im Stadium 54 eine Größe von 76 Zellen pro Organ erreicht haben. Die größten Organe wachsen jedoch gleichzeitig immer noch schneller, währenddessen sie akzessorische Organe abschnüren und Plaques bilden; der Größenunterschied zwischen den Plaques nimmt deshalb mindestens bis zum Stadium 52 noch weiter zu. Der größte beobachtete Plaque enthielt nahezu 300 Zellen. Offensichtlich wachsen die einzelnen Organe innerhalb einer Seitenlinie mit stark unterschiedlichen Raten, was zu einer zunehmenden Heterogenität der Organgrößen führt. Etwa um das Stadium 47 1/2 tritt eine Veränderung im Wachstumsverhalten der Organe ein. Auch die bisher unverändert gebliebenen kleinsten Organe nehmen jetzt an Größe zu. Dieser Wechsel fällt mit dem Übergang zwischen den beiden Wachstumsphasen der Abb. 15a zusammen.

Die Häufigkeitsverteilung der Organgrößen wachstumsgehemmter Larven

Wie erwähnt, kommt in ungefütterten Larven das Wachstum des supraorbitalen Systems etwa im Stadium 47 1/2 zum Stillstand. In Abb. 19a ist die Häufigkeitsverteilung der Größe der Organe solcher wachstumsgehemmter Larven dargestellt. Die Organgrößen reichen von 6 bis zu 65 Zellen pro Organ. Die Verteilung ist vielgipflig, und die Anordnung der Gipfel fügt

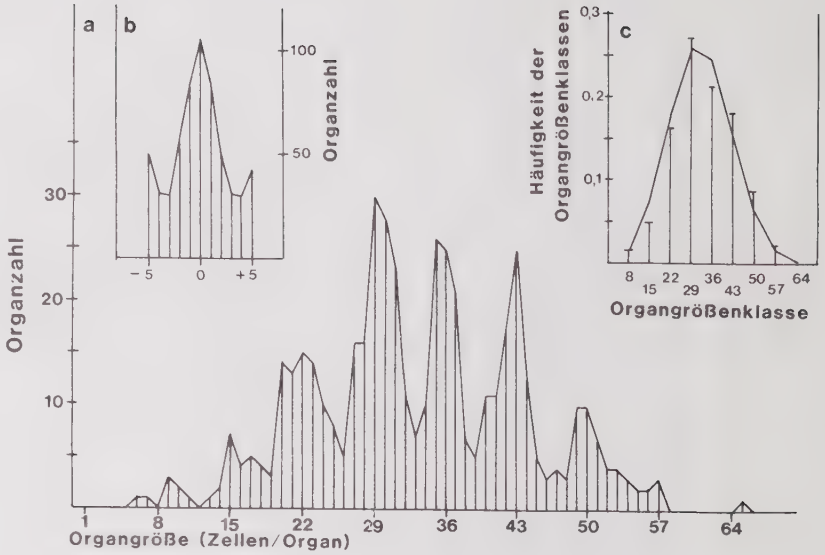
a
b
c
Organzahl
Organzahl
Häufigkeit der Organgrößenklassen
Organgrößenklasse
Organgröße (Zellen/Organ)

Abb. 19

Abb. 19. Häufigkeitsverteilung der Organgrößen. (a) An DAPI-gefärbten Hautpräparaten von ungefütterten, wachstumsgehemmten Larven aus 5 verschiedenen Gelegen wurde die Zellzahl pro Organ von 477 supraorbitalen Seitenlinienorganen bestimmt. (b) Überlagerung der Gipfel. Es wird angenommen, der erste Gipfel sei bei 8 Zellen/Organ, und der Abstand zwischen zwei benachbarten Gipfeln sei 7 Zellen/Organ. Die Organzahlen bei 8, 15, 22 usw. Zellen/Organ werden addiert und geben die Organzahl bei 0 in (b). Die Organzahlen bei 9, 16, 23 usw. Zellen/Organ geben, addiert, die Organzahl bei +1 in (b), usw. Diese Überlagerung der einzelnen Gipfel von (a) ergibt einen symmetrischen Gipfel. (c) Häufigkeitsverteilung der Organgrößenklassen. Die nach dem in (b) angegebenen Schema zu einem Gipfel gehörenden Organe werden zu einer Größenklasse zusammengefaßt. Die Häufigkeiten der den einzelnen Gipfeln entsprechenden Organgrößenklassen sind als senkrechte Balken eingezeichnet. Diese empirische Verteilung wird durch eine Binominalverteilung mit $n = 8$ und $p = 0{,}43$ angenähert (durchgezogene Linie)..

sich am besten in folgendes Schema: der Abstand zwischen den Gipfeln ist regelmäßig und beträgt jeweils 7 Zellen, der erste Gipfel liegt bei 8 Zellen pro Organ, und die Anzahl der Gipfel ist neun. Überlagert man die einzelnen Gipfel in Übereinstimmung mit diesem Schema, um zufällige Unregelmäßigkeiten auszugleichen, so erhält man eine schmale, symmetrische Verteilung (Abb. 19b). Faßt man die nach dem Schema jeweils zu einem Gipfel gehörenden Organe zusammen, so kann die empirische Häufigkeitsverteilung der so gebildeten neun Größenklassen durch eine leicht asymmetrische Binominalverteilung (Zahl der Durchführungen n = 8, Erfolgswahrscheinlichkeit p = 0,43) verhältnismäßig gut angenähert werden (Abb. 19c). Dieses unerwartete Ergebnis erwies sich als der Schlüssel zum Verständnis der Zellvermehrung und der Organbildung im supraorbitalen System.

2. Diskussion

Modell der Zellteilung und Organbildung im supraorbitalen Seitenliniensystem bis Stadium 47 1/2

Eine Zellpopulation bestehe aus "Stammzellen" und "terminalen" Zellen. Die terminalen Zellen seien nicht mehr teilungsfähig; eine Stammzelle habe die Fähigkeit, nacheinander durch inäquale Zellteilungen 7 terminale Zellen zu erzeugen, um dann selbst terminal zu werden. Wird eine solche Population in kleine Gruppen von 8 Zellen aufgeteilt, wobei Stammzellen und terminale Zellen zufällig auf die einzelnen Gruppen verteilt werden, so wird am Ende des Wachstums die Häufig-

keitsverteilung der Größen dieser Gruppen durch eine Binominalverteilung angenähert werden können mit neun Größenklassen und einem regelmäßigen Abstand von 7 Zellen zwischen je zwei benachbarten Größenklassen (wenn die Ausgangspopulation groß ist gegenüber der Gruppengröße von 8 Zellen). Die Zunahme der Zellzahl wird dabei linear sein, falls die Zellzyklusdauer gleich bleibt. Die obigen Annahmen können also die Häufigkeitsverteilung der Abb. 19 und die Linearität der Zellkinetik (Abb. 15) erklären, wenn man die gebildeten Gruppen mit den primären Organen gleichsetzt.

Auf der Grundlage dieser Überlegungen ist es weiter möglich, einige wichtige Parameter des Systems zu berechnen. Die Zellzahl zur Zeit der Einteilung in Organe ist gleich der ursprünglichen Organzahl des supraorbitalen Systems, 16,4, mal 8, der Zahl der Zellen in einem Organ zur Zeit seiner Entstehung. Mit diesem Wert von 131 Zellen ergibt sich aus der Wachstumskurve der Abb. 15a der Zeitpunkt der Einteilung des Primordiums in Organe zu 61 h nach Befruchtung, d. h. Stadium 39 1/2. Zwischen diesem Zeitpunkt und dem Stillstand des Wachstums in ungefütterten Larven müssen 579 minus 131 Zellen erzeugt werden. Da jede Stammzelle 7 terminale Zellen liefert, muß die Zahl der Stammzellen 64 betragen, um für den geforderten Zuwachs an Zellen aufkommen zu können. Da die Gesamtzellzahl linear zunimmt, mit einer Rate von 4,6 Zellen/h, kann die Dauer des Zellzyklus, 13,9 h, berechnet werden, indem man die Zahl der Stammzellen durch die Wachstumsrate dividiert. Im Durchschnitt befinden sich zu jedem Zeitpunkt 29,6 Zellen des supraorbitalen Systems in der S-Phase des

Zellzyklus, daher sollte die Dauer dieser S-Phase 6,4 h betragen (wenn die terminalen Zellen, wie anzunehmen, in G_1 arretiert sind und nicht, nach Durchlaufen einer weiteren S-Phase, in G_2).

Auf der Grundlage dieser Annahmen und Berechnungen, in denen nur die Häufigkeitsverteilung der Organgrößen, die Wachstumskurve und die Anzahl der gebildeten Organe verwendet wurden, läßt sich ein ziemlich genaues Modell des Wachstums und der Organbildung im supraorbitalen System bis zum Stadium 47 1/2 entwerfen (Abb. 20). Einige Punkte dieses Modells sollen im folgenden erläutert werden.

Bei den obigen Überlegungen spielte die Herkunft der zum Zeitpunkt der Organeinteilung vorhandenen Stammzellen und terminalen Zellen keine Rolle. Aus den Transplantationsexperimenten ergab sich, daß neue Zellen im supraorbitalen System immer von den ursprünglich vorhandenen primordialen Zellen herstammen müssen (Teil I). Die einfachste Annahme zur Herkunft der Stammzellen und terminalen Zellen im Stadium 39 1/2 ist daher, daß zu Beginn des primordialen Auswachsens, zwischen den Stadien 33/34 und 35/36, nur Stammzellen vorhanden sind, die sich während der aktiven Verlängerung des Primordiums asymmetrisch teilen und so nach dem gleichen Mechanismus, der für die spätere Entwicklung angenommen wird, terminale Zellen erzeugen (Abb. 20). Etwa 64 Stammzellen müssen nach unserer Rechnung in einem supraorbitalen Primordium vorhanden sein. Tatsächlich findet man diese Zahl von Zellen zwischen den Stadien 33/34 und 35/36 (Abb. 15a). Die

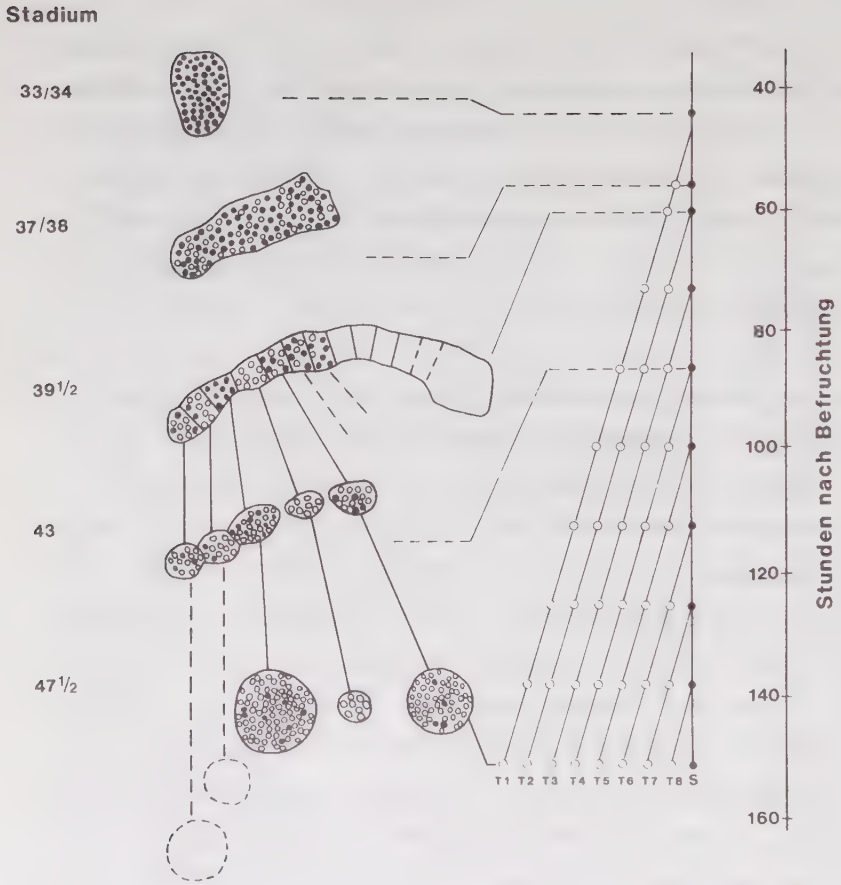
Stadium
33/34
37/38
39 1/2
43
47 1/2
T1 T2 T3 T4 T5 T6 T7 T8 S
40
60
80
100
120
140
160
Stunden nach Befruchtung

Abb. 20

Abb. 20. Modell der Zellteilung und Organbildung im supraorbitalen System. Stammzellen (S, geschlossene Kreise) teilen sich und erzeugen nacheinander 8 terminale Zellen (T_1, T_2 usw., offene Kreise). Die zufällige Verteilung von Stammzellen und terminalen Zellen auf die entstehenden Organe im Stadium 39 1/2 führt zu ausgeprägten Unterschieden in der Größe der primären Organe.

errechneten Zellzyklusparameter dieser Stammzellen - Dauer des Zyklus 13,9 h; Dauer der S-Phase 6,4 h - liegen in einem sinnvollen Bereich.

Nachdem jede Stammzelle sich einmal geteilt hat, und Stammzellen und terminale Zellen etwa in gleicher Anzahl vorliegen, erfolgt die Einteilung des Primordiums in Organe. Die genaue Wahrscheinlichkeit dafür, daß eine der 131 Zellen des Stadiums 39 1/2 eine der 64 Stammzellen ist, beträgt p = 0,488. Die Häufigkeitsverteilung der Organgrößen sollte deshalb nahezu symmetrisch sein, mit einer nur geringen Schiefe zugunsten der kleineren Organe. Am nächsten kommt der empirischen Verteilung eine Binominalverteilung mit p = 0,433 (Abb. 19).

Nach unserer Rechnung findet die Einteilung in Organe im Stadium 39 1/2 statt. Dies stimmt sehr gut überein mit der Beschreibung der morphologischen Veränderungen im supraorbitalen System (Teil I). Die ersten Zeichen einer Fragmentierung des Primordiums können im Stadium 39 1/2 beobachtet werden, und im Stadium 40 ist dieser Prozeß bereits voll im Gange. Die Zunahme der Zellzahl erfolgt zum größten Teil nach dieser Einteilung in Organe (Abb. 5 und Abb. 15a). Da die Stammzellen zufällig verteilt wurden, wachsen die ursprünglich etwa gleich großen Organe (8 Zellen pro Organ) mit sehr unterschiedlichen Raten, je nach Stammzellgehalt (Abb. 20). Die Divergenz der Organgrößen (Abb. 18) läßt sich so erklären. Die kleinsten Organe, die überhaupt keine Stammzelle besitzen, nehmen bis zum Stadium 47 1/2, d. h. in dem Zeitraum, für den das Modell gültig ist, nicht an Größe zu. Organe, in denen

alle 8 ursprünglich zugeteilten Zellen Stammzellen sind, wachsen am schnellsten. Werden die Geraden der Abb. 18 extrapoliert, die die Größen der kleinsten bzw. größten Organe jedes Stadiums verbinden, so ergibt sich, daß im Stadium 39 1/2 alle Organe aus 6 bis 10 Zellen bestehen müssen.

Die primären Organe trennen sich nur sehr allmählich voneinander. Zwischen Stadium 39 1/2 und dem Stadium 47, wenn wirklich alle Organe völlig durch Epidermiszellen voneinander getrennt sind, liegen 3 Tage (Teil I). Andererseits muß die Einteilung in Organe im Stadium 39 1/2 bereits vollständig sein, da sonst die diskreten Größenklassen in der Häufigkeitsverteilung der Abb. 19 nicht erscheinen würden. Nach ihrer Einteilung tauschen also die primären Organe nicht merklich Zellen aus, auch wenn sie aneinander liegen und durch keine sichtbare Grenze getrennt sind.

Da nach unserem Modell die primordialen Zellen zufällig und unabhängig von ihrer Herkunft auf die Organe verteilt werden, sollten primäre Organe keine Zellklone sein. Ein solcher nichtklonaler Ursprung der Organe konnte mit zwei verschiedenen Methoden direkt nachgewiesen werden (Abb. 16, Abb. 17). Das Vorkommen einer einzigen X. borealis-Zelle in einem Organ des Stadium 47, das sonst nur aus X. laevis-Zellen besteht, bestätigt außerdem die Vorstellung, daß es in einem Organ Zellen geben kann, die sich nach dem Stadium 39 1/2 nicht mehr teilen.

Bis zur Wachstumshemmung im Stadium 47 1/2 hat jede Stammzelle durch asymmetrische Zellteilungen 8 terminale, nicht mehr teilungsfähige Zellen hervorgebracht, davon 7 nach der Zuteilung zu einem primären Organ. Bei einer anfänglichen Organgröße von 8 Zellen sollten am Ende 9 verschiedene Organgrößen möglich sein, nämlich: 8 Zellen (keine Stammzelle), 8 + 1 x 7 Zellen (eine Stammzelle), 8 + 2 x 7 Zellen (zwei Stammzellen) usw. bis zu 8 + 8 x 7 Zellen. Die gefundene Verteilung der Organgrößen zeigt tatsächlich diese 9 Gipfel an den erwarteten Stellen, aber die Gipfel sind von einer gewissen Breite. Drei mögliche Fehlerquellen können zu dieser Verbreiterung der Gipfel beitragen.

In Kontrollexperimenten, in denen zwei Personen unabhängig voneinander dieselben Organe auszählten, wurde deutlich, daß der Zählfehler auf Seiten des Experimentators zwar klein, aber nicht vernachlässigbar ist. Die Breite des kleinsten Gipfels reicht von 6 Zellen bis 11 Zellen pro Organ. In diesen Organen findet nach unserem Modell keine Zellteilung statt. Da die beobachtete Breite des Gipfels die aufgrund des Zählfehlers erwartete Breite übersteigt, muß die Einteilung des Primordiums in Gruppen zu 8 Zellen ungenau sein. Ungenauigkeiten im Zellteilungsschema können ebenfalls zur Verbreiterung der Gipfel beitragen. Zwei Fehlermöglichkeiten sind hier in Betracht zu ziehen. Erstens könnte eine Stammzelle sich irrtümlich insgesamt 7mal oder 9mal anstatt 8mal teilen. Zweitens deuten vorläufige Ergebnisse darauf hin, daß die Organeinteilung im vordersten Teil des Primordiums möglicherweise etwas verzögert ist. Einige Stammzellen, die bereits

ihre zweite terminale Zelle abgegeben haben, würden in diesem Fall den vorderen Organen zugeteilt werden, wo sie dann nur noch 6 weitere terminale Zellen zum Wachstum der betreffenden Organe beisteuern könnten. Da aber bereits der Gipfel mit den kleinsten, nicht wachsenden Organen ziemlich breit ist, sind solche Ungenauigkeiten im Zellteilungsschema wahrscheinlich nicht sehr bedeutend.

Der letztere Gedanke führt zu einer weiteren Überlegung. Die Einteilung in Organe sollte mehr oder weniger gleichzeitig über die ganze Länge des Primordiums hinweg erfolgen, da sonst das regelmäßige Muster in der Häufigkeitsverteilung der Organgrößen verwischt wird und z. B. Nebengipfel auftreten können. Da dieses Muster aber gut erkennbar bleibt, folgt, daß eine Verzögerung in der Organeinteilung zwischen entfernteren Teilen des Primordiums kurz sein muß im Verhältnis zur Dauer des Zellzyklus von 13,9 h.

Die Rolle des Wachstums in der Seitenlinienentwicklung

Obwohl während der Entwicklung des Seitenliniensystems vom wenigzelligen Primordium bis zum fertigen, aus Plaques bestehenden Organsystem ganz offensichtlich eine Zunahme der Zellzahl stattfinden muß, werden in der Literatur nur gelegentliche Beobachtungen zu diesem Thema mitgeteilt. Harrison (1904) spricht den auswandernden Primordien eine gewisse "Wachstumsenergie" zu. Bei der Knospung akzessorischer Organe teilen sich die peripheren Zellen der primären Organe (Stone, 1933).

In der vorliegenden quantitativen Untersuchung des Wachstums im supraorbitalen Seitenliniensystem von X. laevis konnten zwei Wachstumsphasen unterschieden werden. Die erste reicht von Stadium 33/34, etwa dem Beginn der Längsstreckung des Primordiums, bis zum Stadium 47 1/2. Die während dieses Zeitraums eintretenden Veränderungen im System - Beginn und Ende der aktiven Ausdehnung des Primordiums, Einteilung in Organe und Fragmentierung des Primordiums - haben keinen erkennbaren Einfluß auf das Wachstumsverhalten. Dieses Verhalten ändert sich aber zwischen den Stadien 47 und 48: die Wachstumsrate wird erhöht, und auch die kleinsten, bisher nicht wachsenden Organe nehmen jetzt an Größe zu. In ungefütterten Larven kommt das Wachstum am Übergangspunkt zwischen diesen beiden Phasen zum Stillstand.

Bei unserer Erklärung der vielgipfligen Häufigkeitsverteilung der Organgrößen (Abb. 19) ist eine wesentliche Annahme, daß jede Stammzelle bis zum Stadium 47 1/2 eine feststehende Anzahl von terminalen Zellen erzeugt. Ob die Stammzellen auf eine bestimmte Zahl von Teilungen festgelegt sind, oder ob einfach die Auswirkungen des Hungerns zur Einstellung der Teilungsaktivität führen, kann noch nicht entschieden werden.

Die Stammzellen teilen sich nicht synchron. Bei einer Zellzyklusdauer von 13,9 h müßte eine solche Synchronie in der Wachstumskurve (Abb. 15a) zu erkennen sein, wenn die Zellvermehrung in allen Embryonen etwa im selben Entwicklungsstadium einsetzt; zwischen den Stadien 33/34 und 43 liegen die Messungen der Zellzahl zeitlich dicht genug. Zudem

geben die Pulsmarkierungsexperimente keinen Hinweis auf synchrone Zellteilungen: würden die Stammzellen eines Primordiums nämlich synchron den Zellzyklus durchlaufen, so sollten auch Primordien ohne markierte Zellen gefunden werden, weil in einigen Fällen die Zellen zum Zeitpunkt des ^{3}H-Thymidinpulses gerade außerhalb der S-Phase waren. Da aber in allen 21 ausgewerteten Primordien bzw. Organreihen immer etwa gleich viele markierte Kerne gefunden wurden, ist eine synchrone Teilung der Stammzellen unwahrscheinlich. Schließlich zeigte auch eine Häufigkeitsverteilung der Organgrößen eines früheren Entwicklungsstadiums (Stadium 45) nicht die regelmäßige Anordnung der Gipfel in der Verteilung, die man unter der Annahme synchroner Zellteilungen erwarten würde (nicht gezeigt).

Daß solche regelmäßigen Gipfel in der Häufigkeitsverteilung aber nach dem Wachstumsstillstand auftreten, und daß die Zellteilungen gerade am Übergang zwischen zwei Wachstumsphasen eingestellt werden, könnte so gedeutet werden, daß die Stammzellen ein festes Teilungsprogramm im Stadium 47 1/2 abgeschlossen haben, und daß der Eintritt des Systems in eine zweite Wachstumsphase in ungefütterten Larven verhindert wird. Der Wachstumsstillstand würde danach nicht an einem willkürlich festgelegten Zeitpunkt eintreten.

Die zweite Phase des beschleunigten Wachstums hängt möglicherweise mit der Bildung akzessorischer Organe zusammen, die nach Stadium 48 beobachtet werden kann. Nach welchem Schema die Zellvermehrung in dieser Phase verläuft, ist

unbekannt. Möglicherweise spielt die Reaktivierung "terminaler" Zellen eine Rolle. Für diese Möglichkeit spricht die Beobachtung, daß die kleinsten Organe, die bis zum Stadium 47 1/2 nicht wachsen, weil sie, so die Erklärung, ohne Stammzellen sind, in der zweiten Wachstumsphase langsam an Größe zunehmen.

Funktionelle Organe bestehen aus Rezeptorzellen und Stützzellen. Nach Stone (1933) sind diese zwei Zelltypen bei Ambystoma bereits in den primären Organen vorhanden. Wann sie in Xenopus-Seitenlinienorganen zum ersten Mal auftreten, ist unbekannt. In DAPI-gefärbten Hautpräparaten konnten diese Zelltypen kaum unterschieden werden, und es können daher bezüglich des Zusammenhangs zwischen Rezeptor- und Stützzellen einerseits, Terminal- und Stammzellen andererseits, keine Aussagen gemacht werden.

Stammzellen und asymmetrische Zellteilung

Der Begriff "Stammzelle" wurde ursprünglich eingeführt für bestimmte Zellen aus adulten, sich selbst erneuernden Geweben (z. B. Hoden, Blutzellen, Darmepithel, Hautepithel). Stammzellen sind nach dieser Definition Zellen, die sich während der ganzen Lebensdauer eines Organismus immer wieder teilen, um einerseits wieder Stammzellen zu liefern, und andererseits ausdifferenzierende Zellen, die den ständigen Verlust differenzierter Zellen aus den entsprechenden adulten Geweben ausgleichen sollen (z. B. Leblond et al., 1967; Papaioannou et al., 1978; Nöthiger et al., 1978; Lajtha, 1979).

In der Embryonalentwicklung sind expandierende Zellpopulationen wegen des notwendigen Wachstums der Gewebe und Organe von grundlegender Bedeutung. Einige dieser expandierenden Populationen mögen von Zellen aufgebaut werden, die sich teilen, um einerseits wieder teilungsfähige Zellen der eigenen Art zu liefern, und andererseits ausdifferenzierende Zellen. Die Teilungsaktivität solcher Zellen mag zum Stillstand kommen, wenn das betreffende Gewebe seine endgültige Größe erreicht hat und statisch wird (z. B. Zentralnervensystem). Es erscheint passend und gerechtfertigt, solche Zellen ebenfalls Stammzellen zu nennen, auch wenn sie nicht im adulten Gewebe teilungsaktiv bleiben. Da ihr Schema von Vermehrung und Ausdifferenzierung mit dem von Stammzellen aus adulten Geweben identisch ist, kann man von einer gemeinsamen "Stammzellogik" sprechen (Sulston und Horvitz, 1977; Papaioannou et al., 1978; Prothero, 1980). In dieser erweiterten Bedeutung wird der Begriff "Stammzelle" in der vorliegenden Untersuchung verwendet.

Mit dem Konzept einer Stammzelle ist gedanklich nicht notwendigerweise ein bestimmtes Zellteilungsschema verbunden. Es gibt zwei Möglichkeiten, wie das "Stammzellverhalten" einer Zellpopulation und das Teilungsschema der einzelnen Zellen zusammenhängen können.

Asymmetrische Zellteilung, bei der immer eine Tochterzelle ausdifferenziert und die andere sich erneut asymmetrisch teilt, wie die Mutterzelle, führt zu einer Stammzellpopulation, in welcher der Anteil der Zellen, die zur Differenzie-

rung bzw. zum Verbleib als Stammzelle bestimmt sind, durch einen zellinternen Mechanismus streng festgelegt ist. Entsprechende Beispiele findet man in der Nematodenentwicklung (Sulston und Horvitz, 1977), in der Ganglion- (Seecoff et al., 1973) und Ovarentwicklung (Nöthiger et al., 1979) von Drosophila, und in anderen Invertebratensystemen.

Eine Stammzellpopulation kann aber auch aus Zellen bestehen, die sich symmetrisch teilen, so daß jede Tochterzelle dieselben Möglichkeiten besitzt. Ein Teil dieser Zellen wird dazu bestimmt, Stammzelle zu bleiben, der andere, auszudifferenzieren. Dies kann entweder in einem Zufallsprozeß entschieden werden, mit bestimmten Wahrscheinlichkeiten für die beiden Möglichkeiten (z. B. Till et al., 1969), oder, wahrscheinlich von größerer Bedeutung, durch äußere Kontrollsignale direkt veranlaßt sein. Im hämopoetischen Stammzellsystem der Mammalia ist möglicherweise der letztere Mechanismus verwirklicht (Schofield, 1979).

Das supraorbitale Seitenliniensystem von Xenopus laevis stellt einen Fall dar, in dem es sehr deutliche Hinweise gibt auf das Vorkommen asymmetrisch sich teilender Stammzellen in einem Vertebraten. Die Entdeckung dieses Zellteilungsmodus wurde hier ermöglicht, oder zumindest sehr erleichtert, durch die Verbindung der Stammzellproliferation mit einem Vorgang, an dem eine sehr kleine Zahl von Zellen beteiligt ist - der Organbildung. Auch in den anderen bekannten Beispielen asymmetrisch sich teilender Stammzellen, bei Invertebraten, ist die Zahl der beteiligten Zellen gewöhnlich niedrig. Es

bleibt die Frage, ob asymmetrische Stammzellteilungen einfach eher beobachtet werden, wenn die Zellzahl des Systems klein ist, oder ob eine unbeabsichtigte Erschöpfung des Stammzellreservoirs durch Zufallsschwankungen in kleinen Stammzellpopulationen am besten durch den strikten Kontrollmechanismus der asymmetrischen Zellteilung verhindert wird.

III. Prinzipien der Musterbildung im supraorbitalen Seitenliniensystem

1. Ergebnisse

Der Zusammanhang zwischen Zellzahl und Organzahl

Eine Reihe von Seitenlinienorganen kann als ein Muster periodisch sich wiederholender Einheiten aufgefaßt werden. Es erhebt sich dabei die Frage, wie die gesamte vorhandene Menge des Materials, hier die Zahl der Zellen, und die Zahl der gebildeten Einheiten zusammenhängen; ob z. B. beide Größen genau festgelegt sind, ob etwa die Zahl der Einheiten festliegt, die Gesamtmenge des Materials aber von Fall zu Fall variiert, so daß die durchschnittliche Größe der einzelnen Einheiten jeweils verschieden ausfällt, usw.

Am supraorbitalen Seitenliniensystem läßt sich folgendes beobachten. Die Gesamtzellzahl des nach der ersten Wachstumsphase arretierten Systems schwankt, von Gelege zu Gelege, von Tier zu Tier, und innerhalb einer Larve von linker zu rechter Seite. Ebenso ist die Organzahl in diesem System nicht genau

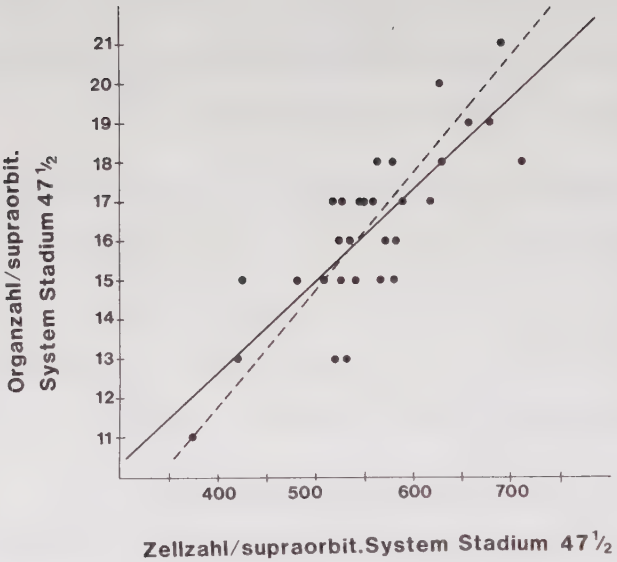

Abb. 21. Zusammenhang zwischen Zellzahl und Organzahl im supraorbitalen System. Für Kaulquappen, die das Ende der ersten Wachstumsphase im Stadium 47 1/2 erreicht haben, wurde die Organzahl in Abhängigkeit von der Gesamtzellzahl des supraorbitalen Systems aufgetragen. Organzahl und Zellzahl sind korreliert, der Korrelationskoeffizient beträgt r = 0,81. Die Regressionsgerade (durchgezogene Linie) weicht nur geringfügig von dem bei konstanter mittlerer Organgröße erwarteten Zusammenhang ab.

festgelegt. Diese Schwankungen sind nicht unabhängig voneinander. Zellzahl und Organzahl des supraorbitalen Systems sind korreliert, mit wachsender Zellzahl nimmt im Durchschnitt die Organzahl zu (Abb. 22). Der Korrelationskoeffizient beträgt $r = 0{,}81$. Der erwartete Zusammenhang zwischen Zell- und Organzahl, wenn man eine mittlere Organgröße von 34 Zellen/Organ zugrunde legt und annimmt, die vorgegebenen Zellen des Systems würden immer in entsprechend viele Organe genau dieser Größe aufgeteilt (gestrichelte Linie), weicht nur gering von der empirisch gefundenen Regressionsgeraden (durchgezogene Linie) ab. Es besteht also eine Tendenz, die durchschnittliche Größe der Organe - also abgesehen von der beschriebenen Heterogenität der Organgrößen (Teil II) - konstant zu halten und das Primordium je nach seiner Größe in eine entsprechende Anzahl Organe aufzuteilen.

Triploide supraorbitale Systeme

Triploide Amphibien, deren DNA-Gehalt pro Zellkern auf das Anderthalbfache erhöht ist gegenüber dem diploiden Normalzustand, besitzen auf das anderthalbfache Volumen vergrößerte Zellkerne und bestehen aus ebenso vergrößerten Zellen. Da die einzelnen Organe dieser Tiere aber im allgemeinen von normaler Größe sind, wie auch die Tiere insgesamt, ist die Zahl ihrer Zellen auf etwa 2/3 verringert (Fankhauser, 1945). Die Untersuchung von Seitenliniensystemen, die aus triploiden Zellen aufgebaut werden, sollte Rückschlüsse erlauben auf die Regeln, nach denen die Einteilung in Organe in diesem System erfolgt. Erste, vorläufige Ergebnisse einer solchen Unter-

suchung, an den rein triploiden Seiten von haploid-triploiden Chimären, liegen vor. Die Gesamtzellzahl des supraorbitalen Systems in wachstumsgehemmten diploiden Larven beträgt 579 ± 77 Zellen (Teil II). Gilt die obengenannte Regel, wonach die Zellzahl pro Organ in triploiden Tieren auf 2/3 des diploiden Wertes reduziert ist, auch für dieses Organsystem, so sollten in triploiden, wachstumsgehemmten Kaulquappen im Durchschnitt 376 Zellen pro supraorbitalem System vorhanden sein. Aus den 7 bisher dafür ausgewerteten Präparaten ergibt sich ein Mittelwert von 351 ± 58 Zellen, also eine gute Übereinstimmung mit der Erwartung.

Aus den drei bisher ausgewerteten Präparaten von triploiden Systemen des Stadiums 40 läßt sich, wegen der schmalen Datengrundlage unter Vorbehalt, der Schluß ziehen, daß dieses Verhältnis von 3:2 zwischen den Gesamtzellzahlen diploider und triploider Seitenliniensysteme nicht erst am Ende der ersten Wachstumsphase des supraorbitalen Systems erreicht wird, sondern während der ganzen Entwicklung besteht: im Stadium 40 beträgt die Zellzahl des diploiden Primordiums 156 ± 14 Zellen, erwartet würden danach für den triploiden Zustand 104 Zellen, gefunden wurden 111 ± 5,6. Ein triploides Primordium war dabei morphologisch nicht von einem diploiden des Stadiums 40 zu unterscheiden, d. h. die Entwicklung triploider Primordien scheint normal und nach unverändertem Zeitschema zu verlaufen.

Die verringerte Zellzahl in triploiden supraorbitalen Systemen könnte bei gleich bleibender durchschnittlicher

Organgröße mit einer um 2/3 verringerten Organzahl verbunden sein oder bei gleichbleibender Organzahl mit entsprechend verkleinerten Organen. Die letztgenannte Möglichkeit ist verwirklicht. Die Organzahl beträgt im diploiden Fall 16,4 ± 1,5 (Teil II), im triploiden Zustand ist sie mit 15,3 ± 2,9 Organen kaum verringert (7 Fälle). Die durchschnittliche Organgröße sinkt damit von etwa 34 Zellen/Organ (diploid) auf 23,0 Zellen/Organ (triploid).

Um die Häufigkeitsverteilung der Organgrößen auf ähnliche Weise wie in Teil II analysieren zu können, müßten wesentlich mehr als die bisherigen 107 Organe ausgezählt werden; bis jetzt läßt sich nur folgendes erkennen: die Organgrößen reichen von 3 Zellen bis 39 Zellen/Organ, am häufigsten treten Größen um 24 Zellen/Organ auf.

2. Diskussion

Einige Prinzipien der Musterbildung im supraorbitalen System

Die im letzten Kapitel zusammengefaßten Ergebnisse sind vorläufig; es sind die ersten Ergebnisse einer gerade erst begonnenen Untersuchung. Trotzdem erlauben sie schon, einige Schlüsse zu ziehen über die Regeln, nach denen sich die Einteilung des Primordiums in Organe vollzieht, und dieses System mit anderen zu vergleichen, in denen sich ebenfalls ein periodisches Muster ausbildet.

In ein und demselben Entwicklungsstadium variiert die Zellzahl des supraorbitalen Systems, sowohl innerhalb eines Tieres zwischen linker und rechter Seite, als auch zwischen Tieren, oft besonders zwischen Tieren verschiedener Gelege. Die Organzahl korreliert dabei mit der Zellzahl. Diese Korrelation ist eigentlich schon auf Grund der Tatsache zu erwarten, daß die Häufigkeitsverteilung der Organgrößen wachstumsgehemmter Larven die beschriebenen regelmäßigen Gipfel zeigt (Abb. 19). Würden die Gesamtzellzahlen und die zugehörigen Organzahlen in dem aus Abb. 21 ersichtlichen Bereich unabhängig voneinander variieren, die mittlere Organgröße also von Linie zu Linie stark schwanken, so müßte dies nach unserem Modell der Zellvermehrung und Organbildung (Teil II) auf jeden Fall von einer übermäßigen Verbreiterung der Gipfel oder deren völligem Verschwinden begleitet sein, wegen entsprechend starker Variation der anfänglichen Organgröße oder des Zellteilungsschemas. Die immerhin vorhandene Streuung der Werte um die Regressionsgerade mag mit der tatsächlich zu beobachtenden Breite der Gipfel der Verteilung zusammenhängen.

Das System zeigt also die deutliche Neigung, bei Schwankungen in der Gesamtzellzahl an der Größe der Organe festzuhalten und dafür zum Ausgleich die Zahl der Organe entsprechend zu variieren. Die anfängliche Organgröße von etwa 8 Zellen/Organ wird aber nicht durch einen Zellzählmechanismus festgelegt, der jeweils 8 Zellen direkt abzählt und zu einem Organ zusammenfaßt. Dies zeigt die Entwicklung triploider supraorbitaler Seitenliniensysteme.

Wie erwähnt, sind triploide Zellen bei Amphibien anderthalbmal so groß wie diploide Zellen, dafür ist in einem triploiden Organ, das in der Regel von der normalen Größe des diploiden ist, die Zahl der Zellen auf 2/3 reduziert (Fankhauser, 1945). Diese Verringerung der Zellzahl beobachtet man auch im triploiden supraorbitalen System von X. laevis, und zwar sowohl im Stadium 40 als auch nach Abschluß der ersten Wachstumsphase, also sehr wahrscheinlich, und im Einklang mit den allgemeinen Feststellungen Fankhausers (1945), über die ganze Frühentwicklung des Systems hinweg bis mindestens zum Stadium 47 1/2. Außerdem scheint der zeitliche Ablauf der Entwicklung triploider Primordien, wieder in Übereinstimmung mit den allgemeinen Angaben Fankhausers (1945), gegenüber diploiden Primordien nicht verändert zu sein.

Wenn nun im Stadium 39 1/2 im triploiden Fall nur 2/3 der normalerweise vorhandenen Zellen zur Verfügung stehen, aber die normale Anzahl von Organen gebildet wird, wie wir gesehen haben, so müssen die entstehenden Organe in Bezug auf die Zellzahl kleiner als im diploiden Fall sein, durchschnittlich 5,3 Zellen groß, und wenn das in der Diskussion zu Teil II entwickelte Zellteilungsschema eingehalten wird, so sollten wachstumsgehemmte Larven triploide Seitenlinienorgane in der Größe zwischen 5 (keine Stammzelle) und 40 Zellen/Organ (5 Stammzellen) besitzen. In der Tat wurden bisher unter den 107 ausgezählten Organe zwischen 3 und 39 Zellen/Organ gefunden. Die durchschnittliche Organgröße ist bei triploiden Organen mit 23,0 Zellen/Organ ziemlich genau um ein Drittel kleiner als bei diploiden. Würde aber ein Zellzählmechanismus die

Größe der zu bildenden Organe festlegen, indem stets 8 Zellen abgezählt und zu einem Organ zusammengefaßt würden, so sollte im triploiden Fall das supraorbitale System im Durchschnitt nur aus etwa 11 Organen bestehen, die aber eine Größenverteilung ähnlich den diploiden Organen zeigen (Größe als Zahl der Zellen pro Organ), was jedoch offensichtlich nicht der Fall ist.

Die Anfangsgröße der Organe wird also nicht über die Zahl der pro Organ zugeteilten Zellen bestimmt, da diese Zahl in diploiden und triploiden Seitenlinien verschieden ist. Was jedoch in beiden Fällen gleich sein dürfte, und daher als Maß für die Organgröße benützt werden könnte, ist einmal die Zellmasse, die einem Organ bei seiner Entstehung zugeteilt wird - die Masse von 8 diploiden oder die Masse von 5,3 anderthalbmal so großen triploiden Zellen. Zum anderen, falls die Abmessungen diploider und triploider Primordien sich nicht unterscheiden, wie vermutet und wie für eine Vielzahl anderer Organe gezeigt (Fankhauser, 1945), sollten auch die Abmessungen der einzelnen Organe bei ihrer Entstehung im diploiden und im triploiden Fall gleich sein. Zwischen diesen beiden Möglichkeiten kann aufgrund der bisher bekannten Ergebnisse noch nicht entschieden werden.

Bei der letztgenannten Möglichkeit, daß die festgelegten geometrischen Abmessungen der Organe deren Größe in Bezug auf die Zellzahl bestimmen, wäre es z. B. denkbar, daß in einem Primordium feststehender Breite im Stadium 39 1/2 quer zur Längsrichtung Grenzen eingezogen werden, die die künftigen

Organe voneinander trennen, und zwar Grenzen in ganz bestimmten, feststehenden Abständen, ohne Rücksicht auf die Gesamtlänge des Primordiums oder die Größe der primordialen Zellen (diploid oder triploid). Danach würde bei feststehender Anfangsgröße der Organe - 8 Zellen in diploiden, etwa 5 Zellen in triploiden Systemen - die Zahl der gebildeten Organe proportional zur Länge des Primordiums sein. Die mittlere Länge des supraorbitalen Primordiums im Stadium 39 1/2 beträgt 430 µm; da im Durchschnitt 16,4 Organe aus einem Primordium entstehen, sollte der Abstand zweier solcher einzuziehender Organgrenzen 26 µm betragen. Zum Abmessen dieser Abstände käme für das Primordium z. B. eine räumlich periodische, aber zeitlich stabile Konzentrationsschwankung eines "Morphogens" in Frage. Turing (1952) hat die prinzipielle Möglichkeit der Entstehung einer solchen chemischen "stehenden Welle" mit definierter Wellenlänge aufgezeigt und auf deren potentielle Bedeutung für biologische Musterbildungsvorgänge hingewiesen.

Das Seitenliniensystem als periodisches Muster

An biologischen Objekten sind periodische Muster außerordentlich weit verbreitet; zwei hinreichend gut charakterisierte Beispiele sollen kurz vorgestellt und mit dem supraorbitalen System verglichen werden.

Das segmentierte Mesoderm von Helobdella triserialis, einem Hirudineen, wird auf beiden Körperseiten von je einem Teloblasten geliefert. Diese Zelle erzeugt durch asymmetri-

sche Zellteilungen nacheinander 32 Stammzellen, die in einer Reihe hintereinander liegen. Jede der Stammzellen teilt sich wiederum einige Male und bildet so einen Mesodermblock, so daß schließlich insgesamt auf jeder Körperseite 32 Mesodermsegmente hintereinander liegen, deren jedes einen Zellklon darstellt (Blair, 1982; Zackson, 1982).

Die Bildung der Somiten bei Xenopus laevis erfolgt nach einem anderen Schema. Das paraxiale Mesoderm besteht zunächst aus zwei langen Zellsträngen, die parallel zur Chorda dorsalis verlaufen. Diese Stränge werden von vorne nach hinten fortschreitend in vielzellige Blöcke zerlegt, die Somiten. Es wird artspezifisch immer dieselbe Zahl von Somiten gebildet; die Länge der paraxialen Mesodermstränge ist normalerweise immer gleich, und damit auch die Länge der Somiten, die "Wellenlänge" der Segmentierung. In haploiden Somiten ist die Zellzahl gegenüber diploiden verdoppelt; da die haploiden Zellen aber nur das halbe Volumen diploider Zellen haben, bleibt das Somitenvolumen gleich (Hamilton, 1969). Wird der paraxiale Mesodermstrang experimentell dünner gemacht, bei gleicher Länge, so bleibt die Zahl der Somiten konstant. Wird der Mesodermstrang experimentell insgesamt verkleinert, d. h. dünner und kürzer gemacht, so bleibt die Zahl der Somiten ebenfalls unverändert. Es wird also unter allen bisher geprüften Umständen immer die normale Zahl der Somiten gebildet; die Länge der einzelnen Somiten paßt sich dabei an die Gesamtlänge des zur Verfügung stehenden Mesodermstranges an, Zahl und Größe der Zellen im Strang sowie dessen andere Abmessungen außer der Länge haben keinen Einfluß auf die Wellenlänge der Segmentierung (Cooke, 1977).

Mit der Mesodermsegmentierung von Helobdella triserialis hat die Organbildung im supraorbitalen Seitenliniensystem von X. laevis am wenigsten Ähnlichkeit. Es wurde im Teil II dieser Arbeit gezeigt, daß weder das ganze supraorbitale System noch die einzelnen primären Organe klonalen Ursprungs sind. Auch ist die Organzahl im supraorbitalen System keine konstante Größe. Für einen ausführlichen Vergleich mit der Somitenbildung bei Xenopus sind die Ergebnisse zur Segmentierung des Seitenlinienprimordiums noch nicht vollständig genug, doch läßt sich ein wesentlicher Unterschied schon erkennen. Während bei der Somitenbildung die Länge der einzelnen Somiten auf die Gesamtlänge des Mesodermstranges abgestimmt wird, so daß eine immer gleiche Zahl von Einheiten gebildet wird, ist im supraorbitalen System eine bestimmte Größe der Einheiten - der Organe - festgelegt: die Gesamtmasse ihrer Zellen, ihr Volumen, ihre Länge oder etwas ähnliches; die Zahl der Einheiten kann dafür variieren. Eine Gemeinsamkeit beider Systeme ist, daß in ihnen Zellzählmechanismen keine Rolle spielen. Das unterscheidet sie beide möglicherweise von der Bildung des segmentalen Mesoderms in Helobdella, bei der die Zahl der gebildeten Einheiten anscheinend über eine festgesetzte Zahl von Stammzellen bestimmt wird.

Wie diese wenigen Beispiele schon zeigen, können biologische Muster, die aufgrund ihrer äußeren Erscheinung als periodisch klassifiziert werden, nach sehr verschiedenen Prinzipien, oder Regeln, gebildet werden. Ob sich bei genauerer Kenntnis einer größeren Zahl solcher Systeme diese schließlich nach dem Mechanismus ihrer Entstehung in bestimmte größere Gruppen

einteilen lassen (abgesehen von Homologie und naher phylogenetischer Verwandtschaft), ob auf molekularer Ebene vielleicht grundlegende Ähnlichkeiten zwischen all diesen Systemen in Erscheinung treten, oder ob die Mechanismen der Bildung periodischer Muster so vielfältig sind wie diese Muster selbst, diese Frage berührt ein Grundproblem, nicht nur der Entwicklungsbiologie, sondern der Biologie überhaupt: das Problem der Vielfalt der Lebewesen.

ZUSAMMENFASSUNG UND EINORDNUNG DER ERGEBNISSE

Unsere Absicht ist, wie in der Einleitung ausgeführt, am supraorbitalen Seitenliniensystem von X. laevis das Zusammenspiel verschiedener morphogenetischer Mechanismen bei der Entwicklung eines verhältnismäßig einfach gebauten Organsystems zu untersuchen. Die ersten Ergebnisse dazu lassen sich wie folgt zusammenfassen.

1. Die supraorbitale Linie, die parietale Linie und die vordere auditorische Gruppe von Seitenlinienorganen entstehen aus einem gemeinsamen Primordium, einer kleinen Epidermisverdickung zwischen Auge und Ohrbläschen. Das Primordium streckt sich ab dem Stadium 33/34, dem dorsalen Augenrand folgend, in die Länge. Der vorderste Teil biegt nach dorsal ab und wird zur parietalen Linie, der hinterste Teil krümmt sich leicht ventrad und wird dann als vordere auditorische Gruppe bezeichnet.

2. Beginnend im Stadium 39 1/2, zerfällt das Primordium zunächst in Fragmente und schließlich in einzelne primäre Organe. Erst nach 3 Tagen sind wirklich alle Organe voneinander durch Epidermiszellen getrennt. Zwischen Stadium 47 und 48 nimmt die Zahl der primären Organe im supraorbitalen System durch die gelegentliche Verdoppelung des vordersten Organs der supraorbitalen Linie von 16,4 $\pm$ 1,5 auf 17,1 $\pm$ 1,5 zu. Ab Stadium 48 beginnen die primären Organe sich zu vervielfältigen und Plaques zu bilden, Gruppen von in einer Reihe dicht beieinander liegenden Organen.

3. Die Längsstreckung des Primordiums erfolgt durch dessen aktive Ausdehnung. Nach der Fragmentierung in primäre Organe werden alle weiteren Lageveränderungen des Systems sehr wahrscheinlich durch passive Umlagerung der Organe durch differentielles Wachstum der Larvenhaut verursacht.

4. Die aktive Ausdehnung des Primordiums mit einer Rate von 20 - 30 µm/h wird begleitet von einer proportionalen Zunahme der Zellzahl; Umgruppierungen der Zellen oder Änderungen von deren Größe oder Form spielen bei dieser Ausdehnung keine Rolle. Die Zunahme der Zellzahl erfolgt über Zellteilungen im Primordium, epidermale Zellen werden während der Längsstreckung des Primordiums und auch während des Wachstums der primären Organe nicht in das Seitenliniensystem integriert. Die Zellteilungen im Primordium sind nicht auf eine Wachstumszone beschränkt.

5. Die Zellzahl im supraorbitalen System nimmt linear zu. Dabei lassen sich zwei Wachstumsphasen unterscheiden. Die erste reicht vom Beginn der primordialen Längsstreckung bis zum Abschluß der primären Organbildung. Obwohl die Zellzahl in dieser Zeit von 60 auf 580 ansteigt, ist zu einem beliebigen Zeitpunkt immer nur eine gleichbleibende Zahl von etwa 30 Zellen in der S-Phase des Zellzyklus. Die zweite Wachstumsphase ist durch eine erhöhte Wachstumsrate gekennzeichnet und verläuft parallel zur Vervielfältigung der primären Organe.

6. Die einzelnen primären Organe wachsen mit stark unterschiedlichen Raten und werden zunehmend heterogener in Bezug auf ihre Größe. Die kleinsten Organe wachsen bis zum Abschluß der primären Organbildung überhaupt nicht. Die einzelnen Organe sind keine Zellklone.

7. In ungefütterten Larven werden die Zellteilungen im supraorbitalen System am Übergang zwischen den beiden Wachstumsphasen eingestellt. Die Häufigkeitsverteilung der Größe der Organe solcher Larven ist vielgipflig, mit regelmäßigen Abständen zwischen den Gipfeln. Die Verteilung wird durch eine Binominalverteilung mit $n = 8$ und $p = 0,43$ gut angenähert.

8. Diese unerwartete Verteilung kann durch die Annahme erklärt werden, daß die Zellvermehrung im supraorbitalen System über asymmetrisch sich teilende Stammzellen erfolgt, wobei immer die eine Tochterzelle sich nicht mehr weiter teilt, während die andere sich wieder nach dem Schema der Mutterzelle teilt. Werden Stammzellen und sich nicht mehr teilende Zellen bei der Organbildung zufällig auf die entstehenden, etwa 8 Zellen großen Organe verteilt, und teilen sich die Stammzellen von da an noch 7mal, insgesamt aber 8mal, so können die Häufigkeitsverteilung der Organgrößen, aber darüber hinaus noch zahlreiche andere Eigenschaften des Systems bis in Einzelheiten einfach erklärt werden.

9. Bei der Bildung des periodischen Organmusters steht die Anfangsgröße der Organe fest, die Zahl der gebildeten Organe richtet sich nach der Größe des jeweiligen Primordiums. Die Anfangsgröße der Organe wird nicht durch die Zahl der ihnen zugeteilten Zellen bestimmt - diese Zahl unterscheidet sich in diploiden und triploiden Organen - sondern entweder stehen die Gesamtzellmasse pro Organ oder die geometrischen Abmessungen eines Organs fest und dienen als Maßstab für die Aufteilung des Primordiums.

Diese Ergebnisse sind ein erster Schritt auf das Ziel, die Morphogenese des supraorbitalen Seitenliniensystems auf Zellebene so vollständig wie möglich zu charakterisieren, aber viele Fragen sind noch offen, z. B.: Ist die Geschwindigkeit der primordialen Längenzunahme eine feste Größe, oder hängt sie von der Zunahme der Zellzahl ab; wird ein experimentell auf die halbe Zellzahl verkleinertes Primordium nach dem Auswachsen halb so lang wie normalerweise sein, aber von der üblichen Breite, oder umgekehrt, lang und dünn; wird bei der Organeinteilung die Zellmasse pro Organ oder die Abmessung der Organe, z. B. deren Länge, als Maß für die Größe dieser Organe benützt; ist dieses Maß unabhängig von der Gesamtgröße des Embryos, oder wird es dessen Größe angepaßt, reguliert? Zumindest einige dieser Fragen sollten mit den bekannten Mitteln der experimentellen Entwicklungsbiologie zu beantworten sein. Dann könnte das supraorbitale Seitenliniensystem hinreichend charakterisiert sein, um unter verschiedenen Gesichtspunkten zu Vergleichen mit anderen morphogenetischen Systemen herangezogen zu werden, wie es in

den Diskussionsabschnitten dieser Arbeit andeutungsweise geschehen ist. Besonders naheliegend wäre dabei ein Vergleich mit einigen anderen Seitenlinien der Xenopus-Larve, wobei diese allerdings erst noch hinsichtlich ihrer Entwicklung charakterisiert werden müßten. Es wäre sicher interessant zu erfahren, welche Parameter des Systems, bei vermutlich gleichen Grundmechanismen, verändert werden, um z. B. die sehr kurze occipitale Linie oder die besonders langen lateralen Linien zu erzeugen.

LITERATUR

Alberch, P. (1982)
Developmental constraints in evolutionary processes.
In Evolution and Development (J. T. Bonner, ed.), pp. 313-332.
Springer Verlag Berlin Heidelberg New York

Blair, S. S. (1982)
Interactions between mesoderm and ectoderm in segment formation in the embryo of a glossiphoniid leech.
Devl Biol. 89, 389-396

Cooke, J. (1977)
The control of somite number during amphibian development: models and experiments.
In Vertebrate Limb and Somite Morphogenesis (ed. D. A. Ede, J. R. Hinchliffe and M. Balls), pp. 433-448. Cambridge University Press

Dijkgraaf, S. (1962)
The functioning and significance of the lateral-line organs.
Biol. Rev. 38, 51-105

Elsdale, T. R., Gurdon, J. B. & Fischberg, M. (1960)
A description of the technique for nuclear transplantation in Xenopus laevis.
J. Embryol. exp. Morph. 8, 437-444

Epperlein, H. H. & Claviez, M. (1982)
Formation of pigment cell patterns in Triturus alpestris embryos.
Devl Biol. 91, 497-502

Escher, K. (1925)
Das Verhalten der Seitenorgane der Wirbeltiere und ihrer Nerven beim Übergang zum Landleben.
Acta zool. Stockh. 6, 307-414

Fankhauser, G. (1945)
The effects of changes in chromosome number on amphibian development.
Q. Rev. Biol. 20, 20-78

Fischberg, M. (1949)
Experimentelle Auslösung von Heteroploidie durch Kälteschock-behandlung der Eier von Triton alpestris aus verschiedenen Populationen.
Genetica 24, 213-329

French, V., Bryant, P. J. & Bryant, S. V. (1976)
Pattern regulation in epimorphic fields.
Science 193, 969-981

Gierer, A. (1981)
Generation of biological pattern and form: some physical, mathematical and logical aspects.
Prog. Biophys. molec. Biol. 37, 1-47

Goodwin, B. C. (1982)
Development and evolution.
J. theor. Biol. 97, 43-55

Hamilton, L. (1969)
The formation of somites in Xenopus.
J. Embryol. exp. Morph. 22, 253-264

Harrison, R. G. (1904)
Experimentelle Untersuchung über die Entwicklung der Sinnesorgane der Seitenlinie bei den Amphibien.
Arch. mikrosk. Anat. 63, 35-149

Horst, C. J. van der (1934)
The lateral-line nerves of Xenopus
Psychiat. neurol. Bl. Amst. 3, 426-435

Jacobson, M. & Hirose, G. (1978)
Origin of the retina from both sides of the embryonic brain: a contribution to the problem of crossing at the optic chiasma.
Science 202, 637-639

Keller, R. E. (1978)
Time-lapse cinemicrographic analysis of superficial cell behavior during and prior to gastrulation in Xenopus laevis.
J. Morph. 157, 223-248

Keller, R. E. (1980)
The cellular basis of epiboly: an SEM study of deep-cell rearrangement during gastrulation in Xenopus laevis.
J. Embryol. exp. Morph. 60, 201-234

Keller, R. E. (1981)
An experimental analysis of the role of bottle cells and the deep marginal zone in gastrulation of Xenopus laevis.
J. exp. Zool. 216, 81-101

Keller, R. E. & Schoenwolf, G. C. (1977)
An SEM study of cellular morphology, contact, and arrangement, as related to gastrulation in Xenopus laevis.
W. Roux's Arch. 182, 165-186

Knouff, R. A. (1935)
The developmental pattern of ectodermal placodes in Rana pipiens.
J. comp. Neurol. 62, 17-71

Lajtha, L. G. (1979)
Stem cell concepts.
Differentiation 14, 23-343

Landacre, F. L. (1926)
The primitive lines of Amblystoma jeffersonianum.
J. comp. Neurol. 40, 471-495

Landacre, F. L. (1928)
The differentiation of the preauditory and postauditory primitiv lines into preauditory and postauditory placodes, lateralis ganglia and migratory lateral-line placodes in Amblystoma jeffersonianum.
J. comp. Neurol. 44, 29-59

Leblond, C. P., Clermont, Y. & Nadler, N. J. (1967)
The pattern of stem cell renewal in three epithelia (esophagus, intestine and testis).
P. Can. Cancer Res. C. 7, 3-30

Mayr, E. (1982)
The Growth of Biological Thought.
The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts and London, England

Mookerjee, S., Deuchar, E. M. & Waddington, C. H. (1953)
The morphogenesis of the notochord in amphibia.
J. Embryol. exp. Morph. 1, 399-409

Murray, R. W. (1955)
The lateralis organs and their innervation in Xenopus laevis.
Q. Jl. Microsc. Sci. 96, 351-361

Nieuwkoop, P. D. & Faber, J. (1967)
Normal Table of Xenopus laevis (Daudin).
Amsterdam: North Holland Publishing Company

Nöthiger, R., Schüpbach, T., Szabad, J. & Wieschaus, E. (1978)
Stem cells and tissue homeostasis in insect development.
In Stem Cells and Tissue Homeostasis (ed. B. I. Lord, C. S. Potten & R. J. Cole), pp. 71-85. Cambridge University Press

Oster, G. & Alberch, P. (1982)
Evolution and bifurcation of developmental programs.
Evolution 36, 444-459

Papaioannou, V. E., Rossant, J. & Gardner, R. L. (1978)
Stem cells in early mammalian development.
In Stem Cells and Tissue Homeostasis (ed. B. I. Lord, C. S. Potten & R. J. Cole), pp. 49-69. Cambridge University Press

Paterson, N. F. (1939)
The head of Xenopus laevis.
Q. Jl. microsc. Sci. 81, 161-234

Poole, T. J. & Steinberg, M. S. (1978)
Amphibian pronephric duct development: in situ analysis of directed tissue migration.
J. Cell Biol. 79, 337a

Poole, T. J. & Steinberg, M. S. (1981)
Amphibian pronephric duct morphogenesis: segregation, cell rearrangement and directed migration of the Ambystoma duct rudiment.
J. Embryol. exp. Morph. 63, 1-16

Poole, T. J. & Steinberg, M. S. (1982)
Evidence for the guidance of pronephric duct migration by a craniocaudally traveling adhesion gradient.
Devl Biol. 92, 144-158

Prothero, J. (1980)
Control of stem cell proliferation: a density-dependent commitment model.
J. theor. Biol. 84, 725-736

Radice, G. P. (1980)
The spreading of epithelial cells during wound closure in Xenopus larvae.
Devl Biol. 76, 26-46

Sato, A. (1976)
Electron microscopic study of the developing lateral-line organ in the embryo of the newt, Triturus pyrrhogaster.
Anat. Rec. 186, 565-584

Schofield, R. (1978)
The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. A hypothesis.
Blood Cells 4, 7-25

Seecoff, R. L., Donady, J. J. & Teplitz, R. L. (1973)
Differentiation of Drosophila neuroblasts to form ganglion-like clusters of neurons in vitro.
Cell Differ. 2, 143-149

Shelton, P. M. J. (1970)
The lateral line system at metamorphosis in Xenopus laevis (Daudin).
J. Embryol. exp. Morph. 24, 511-524

Shelton, P. M. J. (1971)
Structure and function of the lateral line system in larval Xenopus laevis.
J. exp. Zool. 178, 211-232

Stone, L. S. (1922)
Experiments on the development of the cranial ganglia and the lateral line sense organs in Amblystoma punctatum.
J. exp. Zool. 35, 421-496

Stone, L. S. (1923)
On rotation of lateral-line sense organs in Amblystoma punctatum.
Anat. Rec. 25, 144 (Abst.)

Stone, L. S. (1925)
Heterotopic transplantations of the VII and X lateral-line placodes upon the head of Amblystoma punctatum.
Anat. Rec. 29, 375 (Abst.)

Stone, L. S. (1928a)
Experiments testing the phenomenon of growth direction of migratory lateral-line primordia in embryos of Amblystoma.
Anat. Rec. 38, 30 (Abst.)

Stone, L. S. (1928b)
Primitiv lines in Amblystoma and their relation to the migratory lateral-line primordia.
J. comp. Neurol. 45, 169-190

Stone, L. S. (1928c)
Experiments on the transplantation of placodes of the cranial ganglia in the amphibian embryo. III. Preauditory and postauditory placodal material interchanged.
J. comp. Neurol. 47, 117-154

Stone, L. S. (1929)
Experiments on the transplantation of placodes of the cranial ganglia in the amphibian embryo. IV. Heterotopic transplantations of the postauditory placodal material upon the head and body of Amblystoma punctatum.
J. comp. Neurol. 48, 311-330

Stone, L. S. (1931)
Studies on the migratory lateral-line primordia of Amblystoma.
Anat. Rec. 48 (suppl.), 64 (Abst.)

Stone, L. S. (1933)
The development of lateral-line sense organs in amphibians observed in living and vital-stained preparations.
J. comp. Neurol. 57, 507-540

Stone, L. S. (1935)
Experimental formation of accessory organs in midbody lateral-line of amphibians
Proc. Soc. exp. Biol. N. Y. 33, 80-82

Stone, L. S. (1936)
Experimental studies of various developmental stages in the lateral-line system of amphibians.
Anat. Rec. 64 (suppl. 3), 48

Stone, L. S. (1937)
Further experimental studies of the development of lateral-line sense organs in amphibians observed in living preparations.
J. comp. Neurol. 68, 83-115

Sulston, J. E. & Horvitz, H. R. (1977)
Post-embryonic cell lineages of the nematode, Caenorhabditis elegans.
Devl Biol. 56, 110-156

Thiebaud, Ch. H. (1983)
A reliable new cell marker in Xenopus.
Devl Biol. im Druck

Thom, R. (1968)
Une théorie dynamique de la morphogénèse.
In Towards a Theoretical Biology 1, pp. 152-165 (C. H. Waddington, ed.) Edinburgh University Press

Till, J. E., McCulloch, E. A. & Siminovitch, L. (1964)
A stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen colony-forming cells.
Proc. natn. Acad. Sci., U.S.A. 51, 29-36

Trinkaus, J. P. (1976)
On the mechanism of metazoan cell movements.
In The Cell Surface in Animal Embryogenesis and Development (ed. G. Poste & G. L. Nicolson), pp. 225-329. Elsevier/North Holland Biomedical Press

Turing, A. M. (1952)
The chemical basis of morphogenesis.
Phil. Trans. Roy. Soc. London Ser. B. 237, 37-72

Wolpert, L. (1971)
Positional information and pattern formation.
Curr. Topics Develop. Biol. 6, 183-224

Woo Youn, B., Keller, R. E. & Malacinski, G. M. (1980)
An atlas of notochord and somite morphogenesis in several anuran and urodelean amphibians.
J. Embryol. exp. Morph. 59, 223-247

Wright, M. R. (1947)
Regeneration and degeneration experiments on lateral line nerves and sense organs in anurans.
J. exp. Zool. 105, 221-257

Wright, M. R. (1951)
The lateral line system of sense organs.
Q. Rev. Biol. 26, 264-280

Zackson, S. L. (1982)
Cell clones and segmentation in leech development.
Cell 31, 761-770

DANKSAGUNG

Bei Herrn Professor Hausen möchte ich mich herzlich bedanken für die Anregung zu dieser Arbeit, die verständnisvolle Anleitung und die häufigen, sehr oft über den speziellen Gegenstand dieser Arbeit hinausgehenden Diskussionen, die dazu beigetragen haben, mir die Entwicklungsbiologie nahe zu bringen.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Bernd Strebel für seine geschickte Hilfe bei der Arbeit im Labor, bei Roswitha Grömke und Susanne Haase für die Fotoarbeiten, bei Gunilla Weinraub für die pünktliche Anfertigung der Zeichnungen, bei Frau Tanaka-Ingold für die Entzifferung meiner Handschrift und die Ausführung der Schreibmaschinenarbeiten und bei allen Mitarbeitern der Abteilung und des Instituts für ihre stets freundliche Hilfsbereitschaft.

LEBENSLAUF

Name:	Rudolf Winklbauer
Geburtsdatum:	01.04.53
Geburtsort:	Göppingen
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Eltern:	Rudolf Winklbauer und Agnes, geb. Hintermüller
Schule:	1960 - 1964 Volksschule Sparwiesen
	1964 - 1969 Realschule Uhingen
	1969 - 1973 Hohenstaufengymnasium Göppingen
Studium	1973 - 1979 Biologie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
	1973 Aufnahme in die Studienstiftung des deutschen Volkes
	1975 Vordiplom
	1978 mündliche Diplomprüfung, Hauptfach Genetik
	1978 - 1979 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Virusforschung Tübingen bei Prof. Hausen
	1979 - 1983 Doktorand bei Prof. Hausen

Meine akademischen Lehrer waren:

D. Ammermann
F.-W. Bentrup
V. Braun
A. Gierer
F. Gönnenwein
D. Gradmann
K. G. Grell
K.-P. Hadeler
P. Hausen
V. Hemleben
G. Jung
R. Lorenz
D. Mecke
G. F. Meyer
H. Ninnemann
F. Oberwinkler
C. Pelling
H. Probst
W. Rähle
W. E. Reif
A. Rieker
E. Sander
S. Sarkar
B. Schwemmle
U. Seitz
W. Seyffert
D. Sperlich
H. Tichy
G. Weitzel
K. Wöhrmann
H. Zähner
R. Zielke